T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS VII

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

NIKOS BEOPOULOS

SUJET : *Contribution à l'étude des ribonucléases végétales. Etude des conditions d'extraction et de purification, et analyse des propriétés de ribonucléases de racine de Fève.*

SOUTENUE LE 28 SEPTEMBRE 1976 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. HELLER ... Président
KOVOOR
BURI ... Examinateurs
ESNAULT

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Robert ESNAULT qui, en m'accueillant dans son laboratoire, m'a permis de m'initier à la Recherche et m'a constamment encouragé et guidé par ses conseils.

Je tiens à souligner que sans la compréhension qu'il m'a témoignée et l'amitié qu'il m'a accordée, je n'aurais pu mener ce travail à terme. Qu'il trouve ici l'assurance de ma sincère et profonde gratitude.

Je remercie également les autres membres du laboratoire qui, par leur amicale sympathie, ont contribué à la réalisation d'un contexte de travail des plus favorables et à mon adaptation à de nouvelles conditions de vie.

Je voudrais exprimer mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur R. HELLER qui a bien voulu présider ce Jury ainsi qu'à Monsieur A. KOVOOR qui a accepté d'examiner ce mémoire.

Je sais gré à Monsieur J. F. BURI de participer à ce Jury et des entretiens qu'il m'a accordés ; les discussions que nous avons eues à ces occasions m'ont été extrêmement utiles pour l'aboutissement de ces recherches. Je lui exprime toute ma reconnaissance.

Enfin, je ne saurais oublier Monsieur E. SACHE (Institut Choay) et Monsieur N. N. THANG (Institut de Biologie Physico-Chimique) pour les conseils et l'aide qu'ils m'ont apportés respectivement pour les expériences d'électrofocalisation et de synthèse des homopolymères.

A B R E V I A T I O N S

A M P	:	adénosine monophosphate
C M	:	carboxyméthyl
D E A E	:	diéthylaminoéthyl
D N A	:	acide désoxyribonucléique
D N A s e	:	désoxyribonucléase
E D T A	:	éthylène diamine tétracétique
m R N A	:	acide ribonucléique messager
P. M. E.	:	phosphomonoestérase
P. D. E.	:	phosphodiestérase
Poly A	:	acide polyadénylique
Poly G	:	acide polyguanylique
Poly I	:	acide polyinosinique
Poly C	:	acide polycytidylique
Poly U	:	acide poclyuridylique
P N P a s e	:	polynucléotide pyrophosphorylase
P P O	:	2,5-diphényloxazole
P o P o P	:	1,4 bis- [2- (5-phényloxazolyl)] -benzène
R N A	:	acide ribonucléique
R N A s e	:	ribonucléase
Tris	:	tris (hydroxyméthyl) aminométhane.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548109_0005

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 01

MATERIEL ET TECHNIQUES 05

1 - MATERIEL 05

2 - TECHNIQUES 05

a) Extraction 05

b) Purification 05

b. 1. Précipitation au sulfate d'ammonium 05

b. 2. Chromatographie sur échangeur d'ions 06

b. 3. Filtration sur gel 07

c) Mesure des activités enzymatiques 07

c. 1. RNAse 07

c. 1. 1. RNA de TORULA 07

c. 1. 2. Homopolymères 08

c. 2. DNAse 09

c. 2. 1. DNAse acide 09

c. 2. 2. DNAse alcaline 09

c. 3 Phosphomonoestérase 10

c. 4 Phosphodiestérase 10

c. 4. 1. Ca-bis-p-nitrophényl phosphate 10

c. 4. 2. 2'-desoxy-thymidine-3'-p-nitrophényl phosphate 11

c. 4. 3. 2'-desoxy-thymidine-5'-p-nitrhophényl phosphate 11

d) Dosage des protéines 11

e) Synthèse des homopolymères radioactifs 12

f) Préparation des complexes poly (A).poly (U) et poly (I).poly (C) 13

g) Mesure de la capacité d'attaque des structures secondaires 13

h) Détermination du caractère endo ou exonucléolytique 14

PREMIERE PARTIE : EXTRACTION ET PURIFICATION DES RIBONUCLEASES DE RACINE DE FEVE

CHAPITRE 1 : CONDITIONS D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM 15

1 - ETUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION 15

a) Comportement des activités nucléasiques de l'extrait brut vis-àvis des échangeurs d'ions 16

b) Etude des activités nucléasiques en fonction du pH et la molarité du tampon 16

c) Stabilité en fonction du temps et du pH 17

d) Conclusion 17

2 - PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM 17

a) Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium 19

b) Etude de l'agent de dialyse 20

3 - CONCLUSION

CHAPITRE 2 : SEPARATION ET PURIFICATION DES RNAses 24

1 - SEPARATION DE L'EXTRAIT BRUT EN PROTEINES ANIONIQUES & CATIONIQUES 24

2 - NUCLEASES ANIONIQUES 25

a) Chromatographie des nucléases anioniques sur CM-cellulose 25

b) Filtration sur gel 25

c) Chromatographie sur DEAE-cellulose 26

d) Etude de l'homogénéité des fractions A_β et A_γ 27

3 - NUCLEASES CATIONIQUES 28

a) Filtration sur gel 28

b) Chromatographie sur CM-cellulose 28

c) Etude de l'homogénéité des fractions C_α et C_β 29

4 - ETUDE DU COMPORTEMENT DES FRACTIONS X 30

5 - CONCLUSION 30

SECONDE PARTIE : PROPRIETES GENERALES & MODE D'ACTION DES RIBONUCLEASES DE RACINE DE FEV

CHAPITRE 1 : PROPRIETES GENERALES 32

1 - DETERMINATION DU PH OPTIMUM 32

2 - CARACTERISTIQUES CINETIQUES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES 32

3 - INFLUENCE DES CATIONS MONOVALENTS (Na^+, K^+) 33

4 - INFLUENCE DES DIVERS CATIONS DIVALENTS 33

5 - STABILITE THERMIQUE 34

CHAPITRE 2 : ETUDE DU MODE D'ACTION 35

1 - SPECIFICITE VIS-A-VIS DU SUCRE 35

2 - SPECIFICITE VIS-A-VIS DES BASES 36

3 - DETERMINATION DE LA CAPACITE D'ATTAQUE DES STRUCTURES SECONDAIRES 37

a) Conditions de synthèse et de purification des poly (A), poly (U), poly (C) 37

b) Réalisation des duplex (A).poly (U) et poly (I).poly (C) 37

b. 1. Formation des complexes poly (A).poly (U) 38

b. 2. Formation du complexe poly (I).poly (C) 38

c) Mesure de la capacité d'attaque des structures secondaires 38

4 - DETERMINATION DU CARACTERE ENDO OU EXONUCLEOLYTIQUE 38

DISCUSSION ET CONCLUSION 40

BIBLIOGRAPHIE 46

I N T R O D U C T I O N

Les recherches décrites dans ce mémoire s'inscrivent dans le cadre d'une étude du "processing" des RNA chez les Végétaux Supérieurs et elles ont pour origine les observations de TRAPY (39,40) sur la dégradation des RNA de racine de Fève. D'après cet auteur, des ribonucléases présentes en très faible quantité, seraient liées aux RNA. Ces enzymes, bien qu'apparemment inactives dansles conditions habituelles de manipulation des acides nucléiques, entraînent sous certaines conditions expérimentales, la dégradation des RNA. Elles ne provoqueraient qu'un nombre limité de coupures, puisque les produits de dégradation s'accumulent dans la région 4S-10S lors d'une centrifugation en gradient de concentration de saccharose. Cette observation constitue le premier indice de l'existence plus spécifique que celui des autres ribonucléases d'origine végétale décrites dans la littérature (6,49). Cette possibilité nous a donc conduit à entreprendre l'étude des conditions d'isolement et des propriétés de telles ribonucléases présentes dans les racines de Fève.

Cependant, avant d'envisager la démarche expérimentale adoptée, il nous semble utile de rappeler l'état des connaissances sur les activités nucléolytiques des Végétaux Supérieurs. Mais la notion d'activité nucléolytique pouvant correspondre à des enzymes au mode d'action fort différent, il nous semble nécessaire d'en préciser les caractéristiques dans le tableau I.

L'analyse des travaux ayant porté sur les enzymes nucléolytiques des végétaux nous conduit à faire quelques remarques préalables :

- La plupart des études sur les ribonucléases [cf les revues de DOVE (6) et WILSON (49)] , ont porté sur l'évolution des teneurs en RNAses d'organes ou des fragments d'organes placés dans des conditions physiologiques (par exemple mise en survie, sénescence, infection virale ...) ;

- En général, les préparations enzymatiques sont peu ou pas purifiées et de nombreux travaux portent donc sur des mélanges de diverses activités ;

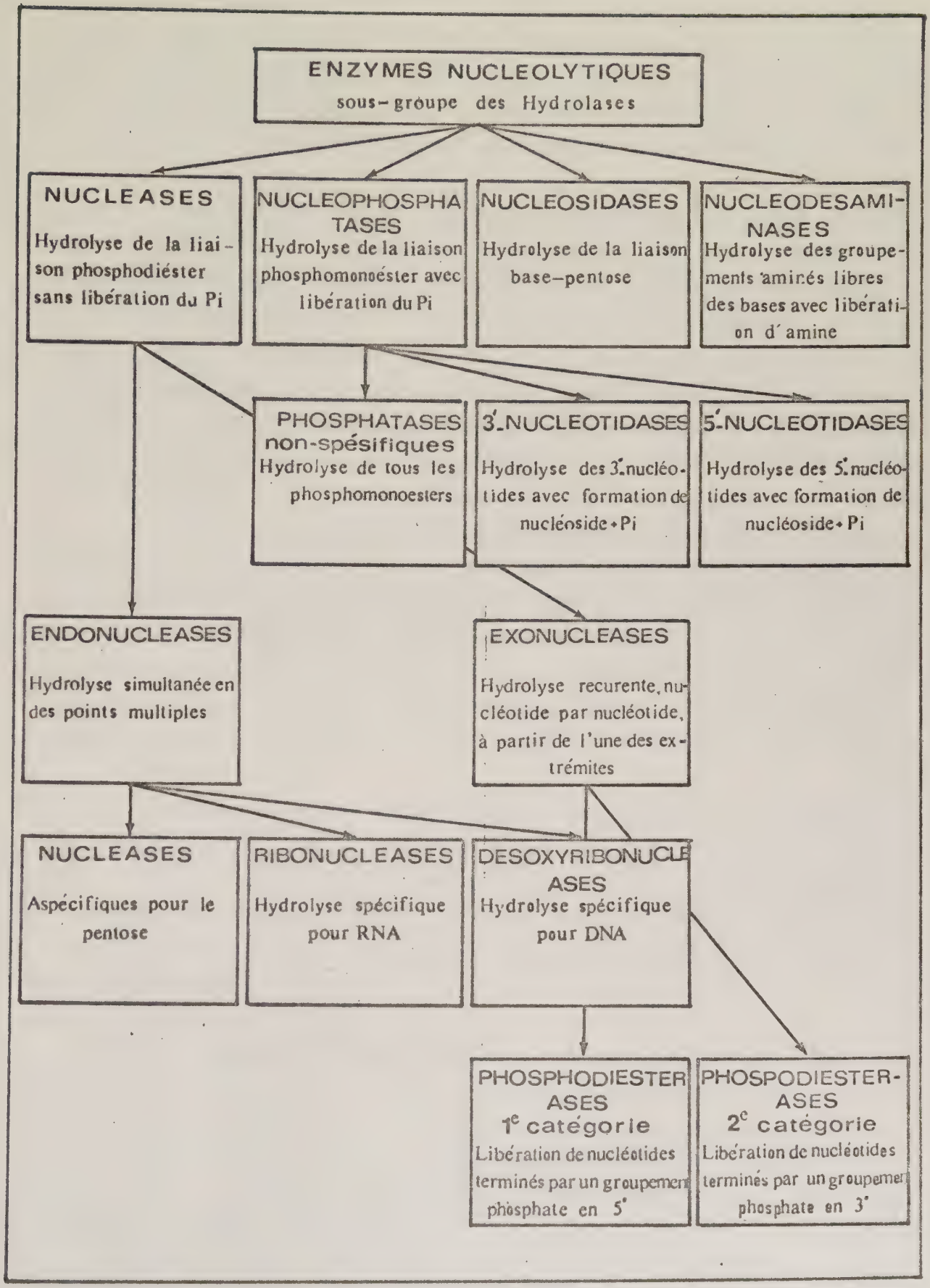


Tableau I: Principaux types d'enzymes nucléolytiques.

- Les enzymes sont extraites d'organes divers et à partir d'une grande variété de plantes ; de plus les techniques d'extractions et les degrés de purification obtenus sont fort variables. Cette diversité rend donc très difficile la comparaison entre les diverses enzymes isolées.

Ces remarques rendent compte de la difficulté à laquelle se heurte toute classification des ribonucléases végétales. Cependant, la classification de REDDI (34) et LASKOWSKI (20) telle qu'elle a été développée par WILSON (46,47,49) semblerait actuellement la plus satisfaisante. Ce dernier auteur a adopté un système "procrustien" pour regrouper les activités nucléolytiques des végétaux en 4 espèces : RNAse I, RNAse II, Nucléase I et Exonucléase I. Nous envisagerons donc brièvement les principales caractéristiques de ces enzymes puis le problème de leur localisation cellulaire.

La RNAse I du fait de sa stabilité est l'enzyme isolée le plus facilement à partir des végétaux et notamment à l'état purifié à partir de l'endosperme de maïs (44) ou de feuille d'orge (18). C'est une endonucléase conduisant à la formation des nucléotides 2'-3' cycliques et attaquant de préférence les purines. D'un P. M. de 20 à 25.000, elle présente un pH optimum voisin de 5,0. Il faut noter cependant que des enzymes regroupés par WILSON dans la catégorie RNAse I, sont capables de libérer des pyrimidines.

La RNAse II a été isolée comme un enzyme distincte de la RNAse I dans le maïs (46,47 ,48) et le tabac (14,33). C'est une endonucléase attaquant le RNA avec libération de nucléotides puriques et pyrimidiques, sous la forme 2'-3' cyclique. Son pH optimum est voisin de 6,0 et son P.M. de 17-20.000. La RNAse II ressemble donc beaucoup à la RNAse I du point de vue de son mode d'action.

La nucléase I, une endonucléase, attaque le RNA et le DNA, de préférence dénaturé. Elle conduit à la libération des nucléotides 5'. D'un P. M. voisin de 33.000, elle présente un pH optimum voisin de 6,0. Les caractéristiques de la Nucléase I sont cependant sujettes à caution étant donné que cette enzyme est très souvent contaminée par une activité 3'-nucléotidase et par la RNAse II.

L'exonucléase I, d'un P. M. de 100000, hydrolyse les polynucléotides à partir de l'extrémité 3' et conduit à la libération de nucléotides 5'. Le pH optimum est compris entre 7 et 9. Les caractéristiques sont analogues à celles de la phosphodiestérase du venin de serpent.

En ce qui concerne la localisation cellulaire des activités nucléolytiques, soulignons, comme le fait remarquer DOVE (6) que les mesures sont effectuées sur des préparations brutes et bien souvent leur distribution n'est envisagée que dans quelques fractions cellulaires. Néamoins, les principales conclusions qui semblent se dégager de ces travaux seraient les suivantes (6,49,7).

La fraction des noyaux ne contiendrait q'une faible proportion de l'activité ribonucléasique. La fraction mitochondriale est une source pour l'isolement de la nucléase I, exemple dans le cas du maïs (46,47,48). La fraction microsomale est riche en RNAse II. Dans cette fraction des RNAse I ou II et nucléases ont été isolées en association avec les ribosomes (51) ou adsorbées sur eux (8,13). La fraction soluble est la source habituelle des préparations de RNAses et notamment de la RNAse I. La proportion des RNAses présentées dans la fraction soluble peut atteindre de 25 à 95 % des RNAses totales ce qui suggère que les activités nucléolytiques peuvent être rendues solubles en utilisant des conditions appropriées. C'est ainsi que la distribution des nucléases des diverses fractions peut être affectée par le changement du tampon et de la force ionique : par exemple les activités nucléolytiques présentes dans les fractions microsomales et mitochondriales de racines de pois varient suivant le tampon utilisé de 9 à 20 % et de 13 à 30 %, respectivement (11). Ces remarques illustrent bien la difficulté d'aboutir à des conclusions cohérentes et réellement significatives.

En ce qui concerne l'évolution des teneurs en RNAse I, II, Nucléase I, WILSON (3) note que leurs proportions relatives varient suivant les organes, les fractions cellulaires et au cours des périodes de croissance, de sénescence ou après les traumatismes. Aucune corrélation directe n'a été établie entre les teneurs en ces RNAses et le métabolisme du RNA ; on observe , par exemple, une augmentation de la teneur en RNAses et en RNA dans les tigelles alors que dans les tissus de réserve des germinations, il se produit une augmentation de l'activité ribonucléasique et une baisse du contenu en RNA.

§§§

L'objet de ce travail est donc l'étude des propriétés des activités nucléolytiques liées aux RNA. Cependant, ces enzymes n'étant présentes qu'en quantité extrèmement faible (39), il aurait été nécessaire, pour atteindre cet objectif, de manipuler des quantités considérables de matériel biologique. Pour surmonter cette difficulté, nous nous sommes proposés de procéder par étapes.

La première a pour but de déterminer les caractéristiques des diverses RNAses présentes dans les cellules de racine de Fève. La seconde aura pour objet , en se basant sur ces résultats, d'isoler les RNAses liées aux RNA et d'approfondir l'étude de leurs propriétés.

Nous envisagerons dans le présent mémoire les résultats obtenus concernant l'extraction, la purification, et les propriétés des nucléases, au sens large, présentes dans la racine de Fève.

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E S

1 - MATERIEL

Les graines de Fèves (Vicia faba, variété Aguadulee) fournies par les Ets. TRUFFAUT (Le Chesnay) sont humidifiées pendant 24 h et mises à germer après enlèvement des téguments dans la vermiculite à 25° C et à l'obscurité. Au bout de 48 h, les racines ayant atteint une longueur de 2,5 à 3 cm sont prélevées.

2 - TECHNIQUES

Les produits utilisés sont de la qualité pur pour analyse (Merck).

a) Extraction

Toutes les opérations sont effectuées à 4° C.

Les racines (10 à 70g poids frais pour les expériences préliminaires, 800 g pour l'isolement des enzymes) sont broyées dans un volume de tampon citrate (la concentration et le pH seront précisés dans le texte) égal au poids frais des racines, au moyen d'un broyeur Polytron. Données du broyage : 5 fois 1 mn à vitesse maximale séparées par 15 secondes d'arrêt.

Après traitement du broyat par du KCl 0,5 M (concentration finale) pendant 15 mn, dans le but de libérer les ribonucléases éventuellement fixées sur les ribosomes, le broyat est centrifugé à 2000 g puis filtré sur gaze.

b) Purification

b. 1. Précipitation au sulfate d'ammonium

L'extrait initial est amené à la concentration désirée au sulfate d'ammonium en utilisant une solution saturée de sulfate d'ammonium dont le pH a été préalablement ajusté. Après une heure à 4° C, le précipité formé est recueilli par centrifugation à 35.000 g, pendant une heure à 4° C.

Le culot est dissous dans un volume minimum de tampon citrate de Na 20 mM pH 5,5 puis dialysé contre 50 volumes de tampon avec 4 changements pendant 24 heures.

b. 2. Chromatographie sur échangeur d'ions

Les échangeurs sont des celluloses microgranulaires de chez Whatman (CM-52 et DE-52).

Pour l'équilibration, l'échangeur est dispersé dans du tampon citrate 20 mM pH 5,5 (cellulose cationique, CM-52) ou phosphate 80 mM pH 7,5 (cellulose anionique, DE-52). Après dégazage et enlèvement de particules fines, le pH de la suspension est amené à la valeur désirée au moyen du composant acide du tampon correspondant. Après plusieurs lavages par le tampon d'équilibration, les celluloses sont coulées dans des colonnes dont les dimensions seront précisées dans le texte.

Après passage de l'extrait, d'un volume égal, ou maximum, au 1/5 de celui de la colonne, les protéines non fixées sont récupérées en lavant l'échangeur par du tampon d'équilibration.

Les protéines retenues sont éluées par des gradients de KCl ou NaCl.

Le débit utilisé est de 12 ml/cm^2/h et les fractions recueillies ont un volume de 5 ml.

Sur chaque fraction sont mesurées la densité optique à 280 nm et les diverses activités enzymatiques.

Les fractions actives sont concentrées par dialyse contre 50 volumes de tampon citrate ou phosphate contenant 15 % de polyéthylène glucol 6.000.

Les tubes de dialyse sont portés 15 mn à ébulition dans l'eau, deux fois successivement. ILs sont ensuite placés dans une solution d'EDTA (sel disodique) 0,01 M, pH 8,0 pendant 24 h à 4° C, rincés à l'eau distillée à nouveau laissés dans la solution d'EDTA durant 48 h enfin abondamment rincés à l'eau distillée. Ces tubes sont conservés à 4° C dans l'eau distillée.

b. 3. Filtration sur gel

Les gels utilisés sont des Biogel P.-30 (Biorad) 100-200 mesh (limite d'exclusion : 40.000 daltons) et Biogel P-60, 100-200 mesh (limite d'exclusion : 60. 000 daltons).

Après gonflement dans du tampon citrate 20 mM pH 5,5 ou phosphate 80 mM pH 7,5 pendant une durée de 15 h, les gels sont coulés par gravité sur une hauteur de 80 à 90 cm dans une colonne de 2,5 cm de diamètre. Après passage de l'extrait, volume 4 à 7 ml, l'élution est réalisée en utilisant un vase de Mariotte et un débit de 12 $ml/cm^2/h$. Sur les fractions recueillies, d'un volume de 5 ml, on mesure la densité optique à 280 nm et des diverses activités enzymatiques.

c) Mesure des activités enzymatiques

c. 1. RNAse

Elles ont été réalisées en utilisant, comme substrat, soit du RNA de Torula, soit des homopolymères.

c. 1. 1. RNA de Torula

Purification du substrat : Le RNA de Torula; P.M-300.000 (Sigma) est purifié suivant la technique de REIGNIER et BURI (36) : solution de RNA à 2 %, dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,8, dialysée contre 10 volumes d'EDTA (sel disodique) 10 mM pH 7,8 pendant une durée de 1 heure puis contre 10 volumes de tampon phosphate 20 mM pH 7,5 ou citrate 20 mM pH 5,5 pendant 24 heures avec plusieurs changements.

La solution dialysée est ajustée à une concentration de 1 % puis centrifugée pendant une durée de 1 heure à 20.000 g à 4° C. La solution de RNA, répartie en tubes hémolyse, est conservée à -30 ° C.

Protocole expérimental

- 1 vol. d'extrait (0,5 à 1 ml) ;
- 1 vol. de solution de RNA ;
- incubation à 35 ° C ;
- arrêt de la réaction : 0,5 vol. d'acétate d'uranyle à 0,75 % dans l'acide perchlorique à 25 %, préalablement refroidi à 4° C ;
- après 15 mn à 4° C, les tubes sont centrifugés à 25000 g pendant 10 mn ;
- mesure de la densité optique à 260 nm du surnageant préalablement dilué quatre fois.

Les résultats sont exprimés soit en densité optique (D. O.), soit en unités d'activités enzymatiques. L'unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme provoquant une augmentation de 0,1 de D.O. en 30 minutes.

c. 1. 2. Homopolymères

Les homopolymères [poly (A), poly (I), poly (U), poly (C)] sont dissous dans du tampon phosphate 10 mM pH 7,0, KCl 0,1 M (concentration finale : 1 mg/ml).

Protocole expérimental

- 20 µl d'enzyme ;
- 80 µl de solution d'homopolymère ;
- incubation à 35 ° C ;
- arrêt de la réaction : 100 µl d'acétate d'uranyle à 0,0625 % dans l'acide perchlorique à 5 % préalablement refroidi à 4° C ;
- après 30 mn à 4° C, les tubes sont centrifugés à 3000 g pendant 15 minutes ;
- mesure de la densité optique à 260 nm du surnageant préalablement dilué quatre fois.

c. 2. DNAse

c. 2.1. DNAse acide

Les mesures ont été effectuées en suivant le protocole décrit par BERNARDI et BERNARDI (4) et utilisant du DNA de thymus hautement polymérisé (NBC) ou préalablement dénaturé par la chaleur.

protocole expérimental

- 200 µl de DNA à 2 mg /ml dans du tampon acétate 150 mM pH 5,0, EDTA 10 mM ;
- 30 µl tampon ;
- 20 µl d'enzyme ;
- incubation de 10 à 120 mn à 35 ° ;
- arrêt de la réaction : addition de 50 µl d'acide perchlorique à 12 %, préalablement refroidi à 4° C ;
- après 10 mn à 4° C, les tubes sont centrifugés à 3000 g pendant 10 mn ;
- mesure de la densité optique à 260 mn du surnageant préalablement dilué quatre fois.

c. 2. 2. DNAse alcaline

Les mesures ont été effectuées en suivant le protocole décrit par LASKOWSKI (19) :

- 200 µl de DNA à 2 mg/ml dans du tampon phosphate 10 mM, pH 7,0 $MgSO_4$ 50 mM ;
- 50 µl d'enzyme ;
- incubation : 2 heures à 35 ° C ;
- l'arrêt de la réaction et les étapes suivantes sont identiques à ceux décrits dans le paragraphe c. 2. 1.

Lorsque les enzymes sont dissoutes dans le tampon citrate le Mg^{++} est remplacé par le Mn^{++} (25).

c. 3. Phosphomonoestérases (P.M.E.)

Les mesures d'activités phosphomonoestérasiques sont réalisées en utilisant comme substrat le 4-nitrophénylphosphate sel disodique, hexahydrate (Merck)

Protocole expérimental

- 3 vol. Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 ;
- 1 vol. 4-nitrophénylphosphate à 5.10^{-3} M ;
- 1 vol. $ZnSO_4$, 7 H_2O 6.10^{-4} M ;
- 1 vol. d'extrait ;
- incubation à 37 ° C ;
- arrêt de la réaction : 2 vol. de $Na_2 HPO_4$, 1M ;
- mesure de la densité optique à 410 nm.

Les résultats sont exprimé en unités d'activité enzymatique (U. E.) La définition adoptée est identique à celle retenue pour les RNAses.

c. 4. Phosphodiestérases (P. D. E.)

Les mesures d'activité phosphodiestérasiques sont réalisées en utilisant comme substrat soit le Ca-bis-p-nitrophényl phosphate (Sigma) soit les 2'-desoxy-thymidine-3'-p-nitrophényl phosphate (substrat spécifique des 3'-phosphodiestérases) et 2'-desoxy-thymidine-5'-p-nitrophényl phosphate (substrat spécifique des 5'-phosphodiestérases) (Boehringer).

c. 4. 1. Ca-bis-p-nitrophényl phosphate

Protocole expérimental

- 5 vol. Tris-HCl 0,1 M pH 8,9 ;
- 6 vol. Ca-bis-p-nitrophényl phosphate 1.10^{-3} M ;
- 1 vol. d'extrait ;
- H_2O q. s. p. 3 ml ;
- incubation à 37° C ;
- arrêt de la réaction : 15 vol. de NaOH 0,05 M ;
- mesure de la densité optique à 400 nm.

Les résultats sont exprimés en unités d'activité enzymatique (U. E.) La définition adoptée étant identique à celle retenue pour les RNAses.

c. 4. 2. 2'-desoxy-thymidine-3'-p-nitrophényl phosphate

Protocole expérimental

- 65 µl de tampon citrate 0,1 M pH 6,0 ;
- 15 µl de 2'-desoxy-thymidine-3'-p-nitrophényl phosphate 20 mM ;
- 20 µl d'enzyme ;
- incubation à 25° C pendant 30 mn ;
- arrêt de la réaction : addition de 2,9 ml de NaOH 0,1 M ;
- mesure de la densité optique à 400 nm.

c. 4. 3. 2'-desoxy-thymidine-5'-p-nitrophényl.phosphate

Protocole expérimental

- 200 µl de Tampon Tris 0,1 M pH 8,9 ;
- 200 µl de 2'-desoxy-thymidine-5'-p-nitrophényl-phosphate,1mM ;
- 20 µl d'enzyme ;
- incubation à 25° pendant 30 mn ;
- arrêt de la réaction : addition de 2 ml de NaOH 0,1 M ;
- mesure de la densité optique à 400 nm.

d) Dosage des protéines

Nous utilisons la méthode de LOWRY (24) telle qu'elle est décrite par BAILEY (2).

Réactifs :

- Réactif A : 2 % de $NaCO_3$ dans NaOH à,1 N.
- Réactif B : 0,5 % de $CuSO_4, 5\,H_2O$ dans du citrate de Na à 1 %.
- Réactif C : (préparé juste avant l'emploi) 50 vol. de A + 1 vol. de B.
- Réactif D : réactif de FOLIN-CIOCALTEU (concentration en acide : 1 N).

Protocole expérimental LITWACK (22)

- 1 vol. de solution à doser ;
- 10 vol. de solution C ;
- 15 mn au bain-marie à 4° C ;
- 1 vol. de réactif D ;
- 30 mn à la température ordinaire ;
- lecture à 750 nm.

Les gammes étalons sont réalisées avec de l'albumine bovine ("fraction V powder", NBC).

e) Synthèse des homopolymères radioactifs

Les nucléosides diphosphates ($ADP-^{14}C$, activité spécifique : 40 mCi/mmole, $UDP-^{3}H$, activité spécifique : 3 Ci/mmole, $CDP-^{3}H$, activité spécifique : 10 ci/mmole, provenant de "The Radiochemical Center," Amersham) sont dilués avec des nucléosides diphosphates froids de façon à obtenir des activités spécifiques de 1 µCi/µmole dans le cas de l'ADP et 10µCi/µmole dans le cas de l'UDP et du CDP.

La polynucléotide pyrophosphorylase (lot D, activité : 10U./20 µl) a été fournie par M. N. N. Thang.

Protocole expérimental

- Tris pH 8,0 : 10 mM ;
- $MgCl_2$: 5 mM ;
- EDTA : 0,1 mM ;
- Nucléoside diphosphate : 10 mM ;
- PNPase : 5 unités ;
- incubation à 35° C.

La polymérisation est suivie en prélevant des aliquotes de 5 µl auxquel on joint 1 ml de PCA à 2,5 % et une goutte d'albumine à 1 %. Après précipitation à 4° C pendant 30 mn, les solutions sont filtrées sur disques Millipore. Ceux-ci sont lavés par du PCA à 1 % puis à 0,01 % et après séchage, ils sont comptés au Scintillateur Intertechnique SL 30 (solution scintillante : PPO 4g PoPop. 0,1 g Toluene, 1 l).

A la fin de la polymérisation, les homopolymères sont précipités en ajoutant 2 volumes d'alcool absolu.

La purification des polymères est décrite dans le texte.

f) Préparation des complexes poly (A). poly (U)et poly (I).poly (C)

Les polymères radioactifs sont dissous dans du tampon Tris 50 mM pH 7,5, KCl 0,1 M et leurs concentrations sont évaluées, en tenant compte des coefficients d'extinction molaire , par la mesure de leur absorbance à 260 nm. Des solutions des polymères froids de concentration équimolaire, sont alors préparées dans le même tampon.

L'application de la méthode de variations continues permet de déterminer les volumes de solution à utiliser pour obtenir des complexes présentant une structure secondaire. Cette méthode est basée sur la mesure de la densité optique de mélanges constitués à partir des solutions d'homopolymères et de telle sorte que la concentration totale en nucléotide demeurant constante, seul varie le rapport des deux polymères.

g) Mesure de la capacité d'attaque des structures secondaires

Conditions du test :

- 80 µl de complexes, dans Tris 50 mM pH 7,5, KCl 0,1 M ;
- 20 µl d'enzyme ;
- incubation à 25 ° C ;
- précipitation par acétate d'uranyle 0,0625 % dans PCA 5 %, préalablement refroidi ;
- après 30 mn à 4° C, les tubes sont centrifugés à 3000 g pendant 15 mn.

Le culot est filtré sur un filtre en fibres de verre (Schleider et Schull, n° 6) et lavé par du PCA à 1 %.

La détermination de la radioactivité est effectuée suivant la technique précédemment décrite.

h) Détermination du caractère endo ou exonucléolytique

Hydrolyse des homopolymères : Poly(A),poly(U),poly(C)

- 40 µl d'homopolymère ;
- 10 µl d'enzyme ;
- incubation à 25° C.

Analyse des produits d'hydrolyse :

Des aliquotes de 20 µl sont déposés sur papier Whatman n° 1 ou 3 MM et la chromatographie est effectuée pendant 15 à 24 h en utilisant le mélange de n-propanol-NH_3-eau distillée (55/10/35,V/V/V).

Le chromatogramme est découpé en bandes de 1 cm haut, qui sont mises à éluer dans 500 µl, HCl 0,1 N pendant une heure. La radioactivité est déterminée après addition de 500 µl de Soluène 350 et 3 ml de solution scintillante (cf. paragraphe e).

PREMIERE PARTIE

EXTRACTION ET PURIFICATION DES RIBONUCLEASES DE RACINE DE FEVE

C H A P I T R E 1

CONDITIONS D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

1 - ETUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION

La grande diversité des conditions d'extraction des RNAses végétales ne permet pas d'utiliser une technique qui pourrait être considérée comme un protocole de "base". Cependant, JERVIS et PIRIE (15), dans le cas des RNAses de feuilles de Tabac, on aboutit à des conclusions assez proches de celles qui sont à l'origine de nos recherches.Nous avons donc entrepris de vérifier la validité de leur méthode d'extraction dans le cas de notre matériel.

Les principales étapes du protocole d'extraction de JERVIS (14) sont :

- un broyage en présence de citrate de Na 50 mM 6,0 ;
- une diminution du pH du broyat jusqu'à une valeur de 4,0 (contact pendant une heure) ;
- une précipitation par le sulfate d'ammonium à un pourcentage de saturation de 85 % après que le pH ait été ramené à une valeur de 5,5.

La seconde étape (diminution du pH jusqu'à 4,0) a vraisemblement pour rôle d'inhiber, tout au moins partiellement, les P. M. E. et P. D. E. et de conduire, par le précipité qui se produit dans ces conditions, à une purification grossière de l'extrait.

La vérification de l'intérêt de ce type de traitement a été entreprise en étudiant la stabilité en fonction du temps et du pH des RNAses, P. M. E. et P. D. E. présentes dans nos extraits après sépa-

ration en protéines anioniques et cationiques. Les résultats présentés dans ce paragraphe auront donc trait à une étude du comportement des protéines de l'extrait brut vis-à-vis des échangeurs d'ions puis à celle des propriétés des activités nucléasiques des protéines isolées.

a) Comportement des activités nucléasiques de l'extrait brut vis-à-vis des échangeurs d'ions.

Les protéines extraites des racines de Vicia faba suivant les conditions décrites ci-dessus, après traitement par du KCl 0,5 M (concentration finale) dans le but de libérer les ribonucléases éventuellement fixées sur les ribosomes, ont été chromatographiées soit sur CM-52 (échangeur cationique) soit DE-52 (échangeur anionique). Les protéines retenues dans chaque type d'échangeur sont éluées par addition de NaCl 1 M dans le tampon de chromatographie.

Les résultats, présentés dans la figure 1, montrent que la majorité des protéines de l'extrait ont un comportement de type anionique ; elles ne sont pas fixées sur la CM-52 mais retenues par la DE-52. Les deux types de protéines ainsi isolées (cationique et anionique) présentent des activités RNAsiques et phosphono et phosphodiestérasique. Il faut noter que dans ces conditions, les activités ribonucléasiques sont fortement contaminées par les activités estérasiques.

b) Etude des activités nucléasiques en fonction du pH et de la molarité du tampon.

Les activités RNAsiques des protéines anioniques et cationiques ont été mesurées en fonction du pH et de la molarité du tampon. Les activités maximales ont été obtenues, pour les RNAses anioniques à un pH de 5,5-6,0 et 20 mM citrate, et pour les cationiques, à un pH de 7,5 et 80 mM phosphate.

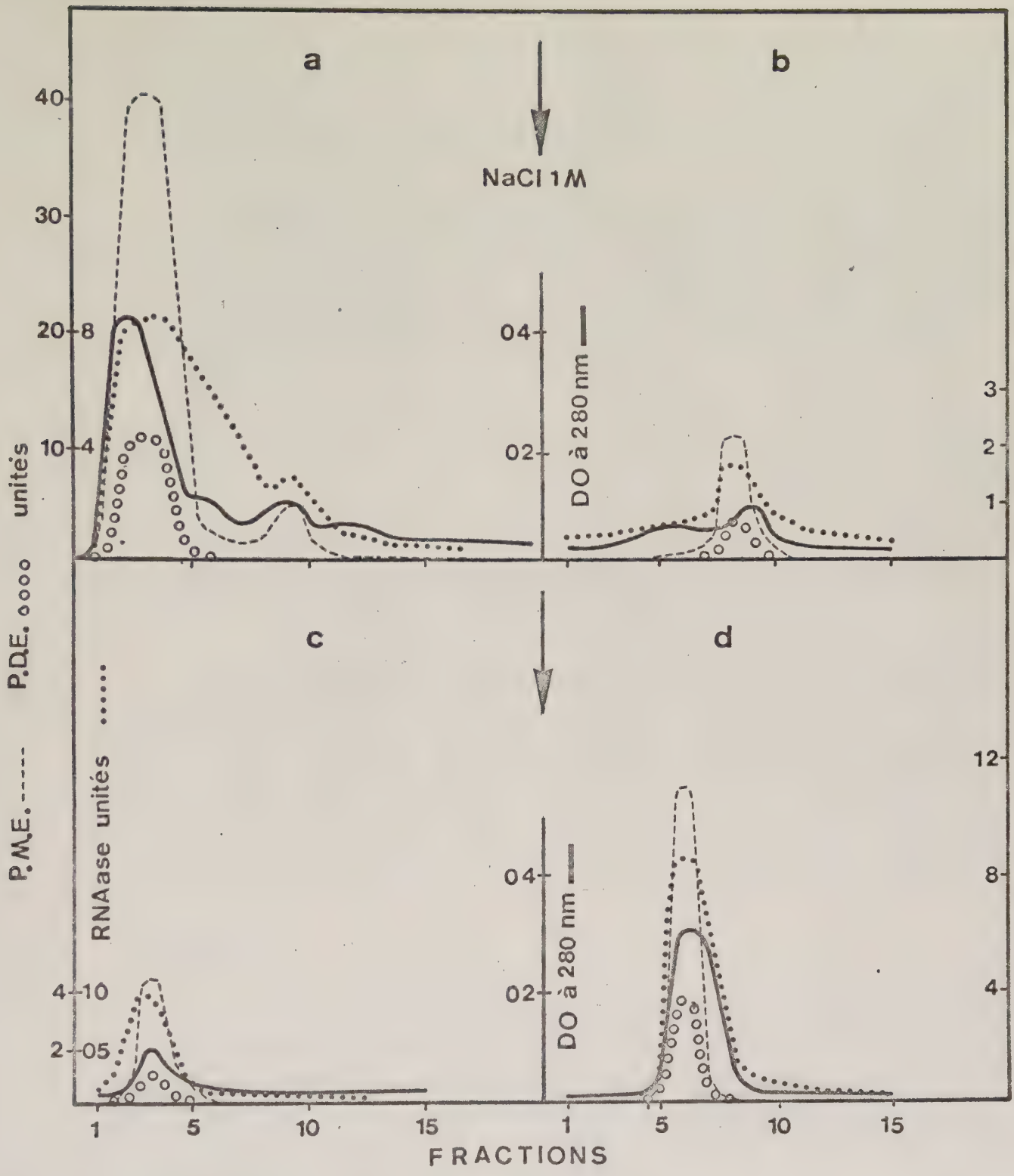


Figure 1: Chromatographie de l'extrait brut sur CM-cellulose (a & b) et sur DEAE-cellulose (c & d).

Volume de l'échantillon: 4ml; colonne: 2,5x12cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon de chromatographie: citrate de Na 20mM pH 5,5 (CM 52) et phosphate de Na 80mM pH 7,5 (DE 52); élution des protéines fixées: tampon de chromatographie contenant du NaCl 1M.

c) Stabilité en fonction du temps et du pH

Les protéines anioniques présentant une activité estérasique brute beaucoup plus élevée que les cationiques, la mesure de l'influence de la diminution du pH, jusqu'à une valeur de 4,0 a été réalisée uniquement dans le cas des protéines anioniques. Elle a consisté à déterminer la stabilité en fonction du pH et du temps des divers types d'activité enzymatique.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II. Leur analyse permet de constater l'excellente stabilité des RNAses et que des pH inférieurs à 4,0 sont nécessaires pour provoquer une inactivation des estérases. Il faut noter cependant que, même après une durée de 24 heures à 37° C à pH 3,0, l'activité estérasique (aussi bien dans le cas des P. M. E. que des P. D. E.) est encore loin d'être négligeable.

Ces données permettent donc de conclure que la diminution du pH de l'extrait brut jusqu'à une valeur de 4,0 n'entraîne pas de perte sensible de l'activité estérasique. Comme de plus, nous n'avons pas observé avec notre matériel, de formation d'un précipité lors de ce traitement, il est donc permis de considérer cette étape (acidification jusqu'à pH 4,0 et conservation pendant 1 heure à 4° C de l'extrait initial) comme inutile.

d) Conclusion

Ces résultats préléminaires nous ont permis de constater que les activités RNAsiques présentes dans les racines de Fève se répartissent en deux types de protéines : anioniques d'une part, dont le pH optimum est voisin de 5,5, et cationiques d'autre part, pH voisin de 7,5. Ces activités sont fortement contaminées par des P. M. E. et P. D. E., qui ne peuvent être inactivés par un traitement de l'extrait à pH 4,0.

a

h. \ pH	3,0	4,0	5,0	6,0
0	22	22	23,6	24
1	22	22	23	24
5	22	21,8	22,8	23
15	16,8	19,2	22,2	22,6
24	16	19	22	22

b

h. \ pH	3,0	4,0	5,0	6,0
0	5,4	6,8	7,3	7,5
1	5,3	6,6	7,0	7,5
5	3,7	5,3	6,1	7,0
15	2,3	2,2	2,8	4,0
24	2,1	2,2	2,3	3,8

c

h. \ pH	3,0	4,0	5,0	6,0
0	0,09	0,17	0,19	0,20
1	0,08	0,16	0,18	0,19
5	0,05	0,08	0,16	0,16
15	0,04	0,05	0,14	0,16
24	0,04	0,04	0,12	0,13

Tableau II: Stabilité, en fonction du temps en heures et du pH, des RNAases, P.M.E. et P.D.E. présentes dans les protéines anioniques.

a- activité de RNAase à pH 5,5.

b- activité de P.M.E. à pH 8,0.

c- activité de P.D.E. à pH 8,9.

Les activités sont exprimées en unités enzymatiques.

Le protocole d'extraction retenu est donc le suivant :

- broyage des racines dans citrate 20 mM pH 5,5 ;
- addition de KCl (0,5 M concentration finale) : 15 mn à 4° C ;
- centrifugation à 2000 g et filtration sur gaze ;
- le surnageant constitue l'extrait initial.

Cependant, dans sa technique JERVIS utilise pour récupérer les RNAses une précipitation par le sulfate d'ammonium en portant la concentration à une valeur égale à 85 % de la saturation. Il est permis de se demander si une purification partielle des RNAses ne pourrait être obtenue en réalisant une précipitation fractionnée des protéines totales de l'extrait. Cette éventualité nous a donc conduits à entreprendre une étude de la répartition des activités RNAsiques et phosphoestérasiques, en fonction du pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium.

2 - PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Dans un article consacré aux ribonucléases végétales, REDDI (35) indique qu'au cours de la dialyse succédant à la précipitation par le sulfate d'ammonium, un important précipité se produit et, de plus, que celui-ci est dépourvu d'activité RNAsique. Un comportement de même type, dans le cas de notre matériel, pourrait donc constituer une étape intéressante de purification partielle.

La démarche suivie au cours de cette étude a consisté tout d'abord à suivre l'évolution de la précipitation des RNAses et phosphoestérases au cours d'une précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, puis à vérifier si le précipité formé au cours de la dialyse contre l'eau est dépourvu d'activité RNAsique.

a) Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium

Le protocole expérimental adopté est présenté schématiquement dans la figure suivante.

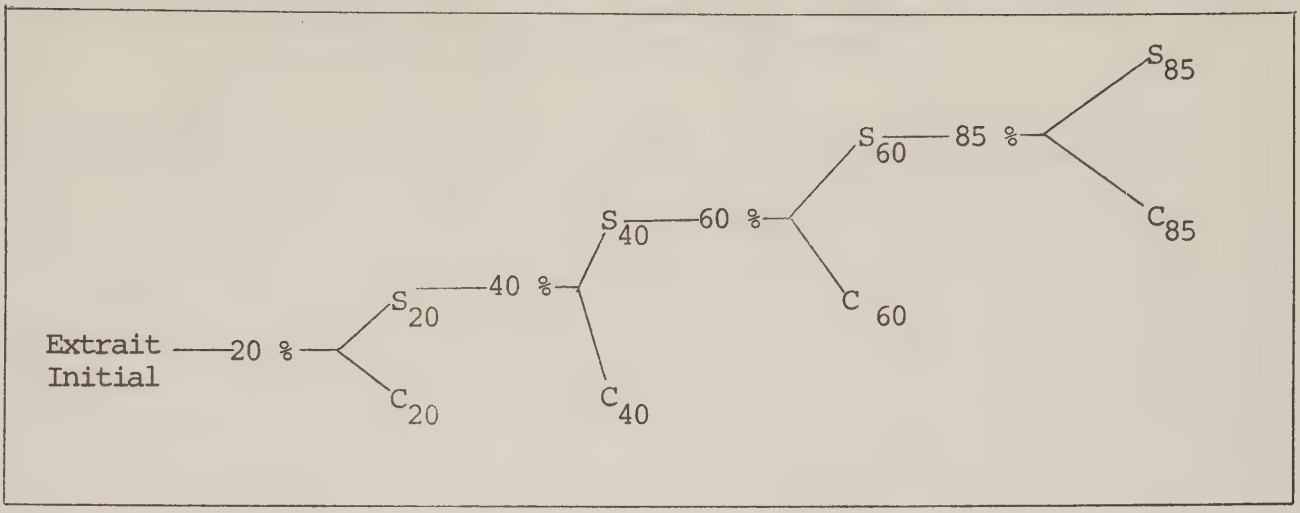


Figure : Précipitation fractionnée d'un extrait initial de racine de Fève pour le sulfate d'ammonium.

Les valeurs indiquées en % correspondent au pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium.

S : Surnageant et C : Culot.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 2. Leur analyse permet de constater qu'une proportion importante de protéines précipite à 20 % de sulfate d'ammonium mais que les phosphoestérases et RNAses ne commencent à précipiter qu'à 40 %. Le maximum de précipitation des phosphoestérases est atteint à 60 % et celui des RNAses à 85 %.

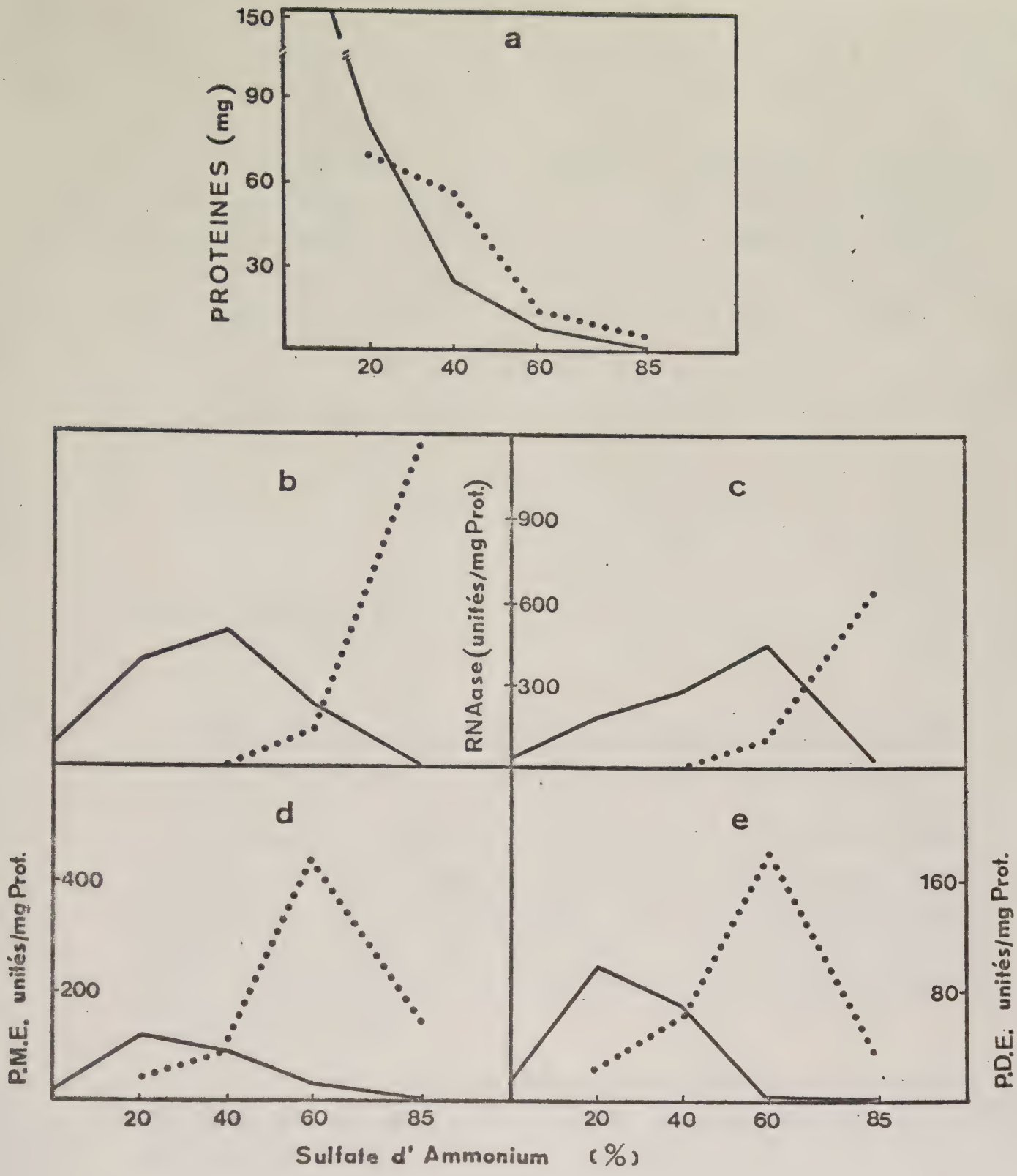


Figure 2: Précipitation fractionnée de l'extrait initial par le sulfate d'ammonium.

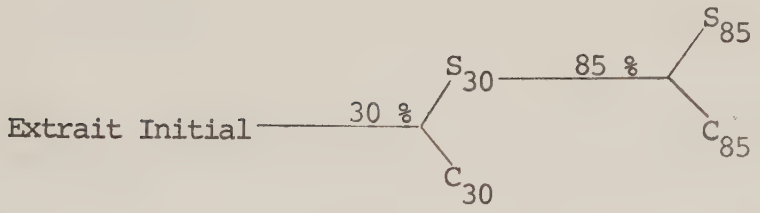
Les surnageants et les culots (après dissolution) sont dialysés contre du citrate de Na 20mM pH 5,5. Les aliquotes destinés aux mesures d'activité enzymatique sont soumis à une nouvelle dialyse contre le tampon correspondant à l'activité à mesurer.

a: teneur en protéines totales - b: activité spécifique des RNAases à pH 5,5 - c: activité spécifique des RNAases à pH 7,5 - d: activité spécifique des P.M.E. - e: activité spécifique des P.D.E.

(———) : surnageant - (.....) : culot.

Ces résultats nous ont conduits à retenir, pour la suite de ces travaux, un premier traitement pour le sulfate d'ammonium à 30 % qui entraîne la formation d'un important précipité de protéines pratiquement dépourvu d'activité RNAsique, une seconde précipitation, obtenue en portant le pourcentage du sulfate d'ammonium à 85 %, permet de récupérer la totalité des RNAses.

Le schéma suivant résume les opérations :



b) Etude de l'agent de dialyse : comparaison entre l'eau distillée et tampon citrate

Après application du protocole décrit au paragraphe précédent, les déterminations des protéines et des activités enzymatiques ont été effectuées dans le cas des surnageants (S_{30} et S_{85}) sur des aliquotes préalablement dialysés contre de l'eau distillée ou du citrate de Na pH 5,5. Dans le cas des culots (C_{30} et C_{85}), ceux-ci ont été préalablement dissous dans du tampon citrate.

A l'inverse de la dialyse contre le citrate, celle contre de l'eau distillée entraîne la formation d'un précipité important sauf toutefois dans le cas du S_{85}.

Les données du tableau III résument les résultats les plus intéressants. Il apparaît que le précipité qui se produit lors de la dialyse contre l'eau distillée contient près de 2/3 des protéines et surtout de l'activité RNAsique. Ce résultat nous conduit donc à rejeter la dialyse contre l'eau distillée. Ce tableau montre de plus que la précipitation initiale par le sulfate d'ammonium à 30 % de saturation permet d'obtenir une purification partielle importante. En effet, près de 70 % des protéines sont ainsi précipitées, alors que la quasi totalité de l'activité RNAsique reste en solution (Figure 3).

3 - CONCLUSION

Les études présentées dans ce chapite avaient pour objet de déterminer si la méthode JERVIS (14), considérée comme protocole de référence, pourrait s'appliquer à notre matériel.

Les résultats obtenus ont permis de simplifier cette méthode et d'améliorer la purification partielle obtenue par l'utilisation du sulfate d'ammonium. En effet, l'acidification à pH 4,0 de l'extrait initial, non seulement ne provoque pas la formation d'un précipité, mais elle est presque totalement inefficace sur les activités phosphomono et phosphodiestérasique. D'autre part, une première précipitation de l'extrait initial par du sulfate d'ammonium à 30 % de saturation permet de se débarasser de près de 2/3 des protéines de l'extrait, alors que la perte en activité ribonucléasique est pratiquement négligeable.

Contrairement aux résultats présentés par REDDI (35), nous avons constaté que la dialyse contre de l'eau du précipité, obtenue par le sulfate d'ammonium à un pourcentage de saturation de 85 %, entraîne une perte très importante en activité enzymatique. Cette différence de comportement, ainsi que celle observée lors de l'acidification de l'extrait initial à pH 4,0 pourrait avoir pour origine la différence du matériel biologique. En effet,

MESURE	EXTRAIT INITIAL	C_{30}	S_{30}			C_{85}			S_{85}
			DIALYSE/ EAU		DIALYSE contre CITRATE	DIALYSE/ EAU		DIALYSE contre CITRATE	
			S	⬭		S	⬭		
PROTEINES (mg)	115,5	83	/	/	26	5	7,4	13,7	2,0
						Σ_p = 12,4			
						Σ_t = 26,1			
RNAase pH 5,5 (unités)	4013	165	1060	2940	4.536	870	3.080	4.070	Traces
			Σ_p = 4.000			Σ_p = 3.950			
			Σ_t = 8536			Σ_t = 8020			
ACTIVITE SPECIFIQUE (Σ_t UE/Σ_t Pro	34,7	2,0	327			297			/

Tableau III: Etude comparative de l'eau distillée et du tampon citrate de Na 20 mM pH 5,5, comme agent de dialyse.

Les déterminations des protéines et des activités enzymatiques ont été effectuées dans le cas des surnageants (S_{30} et S_{85}) sur des aliquotes préalablement dialysés contre de l'eau distillée ou du tampon citrate. Dans le cas des culots (C_{30} et C_{85}), ceux-ci ont été préalablement dissous dans du tampon citrate pH 5,5 puis dialysés contre de l'eau distillée ou du citrate.

Σ_p= somme partielle; Σ_t = somme totale.

S = surnageant
⬭ = précipité
} après dialyse.

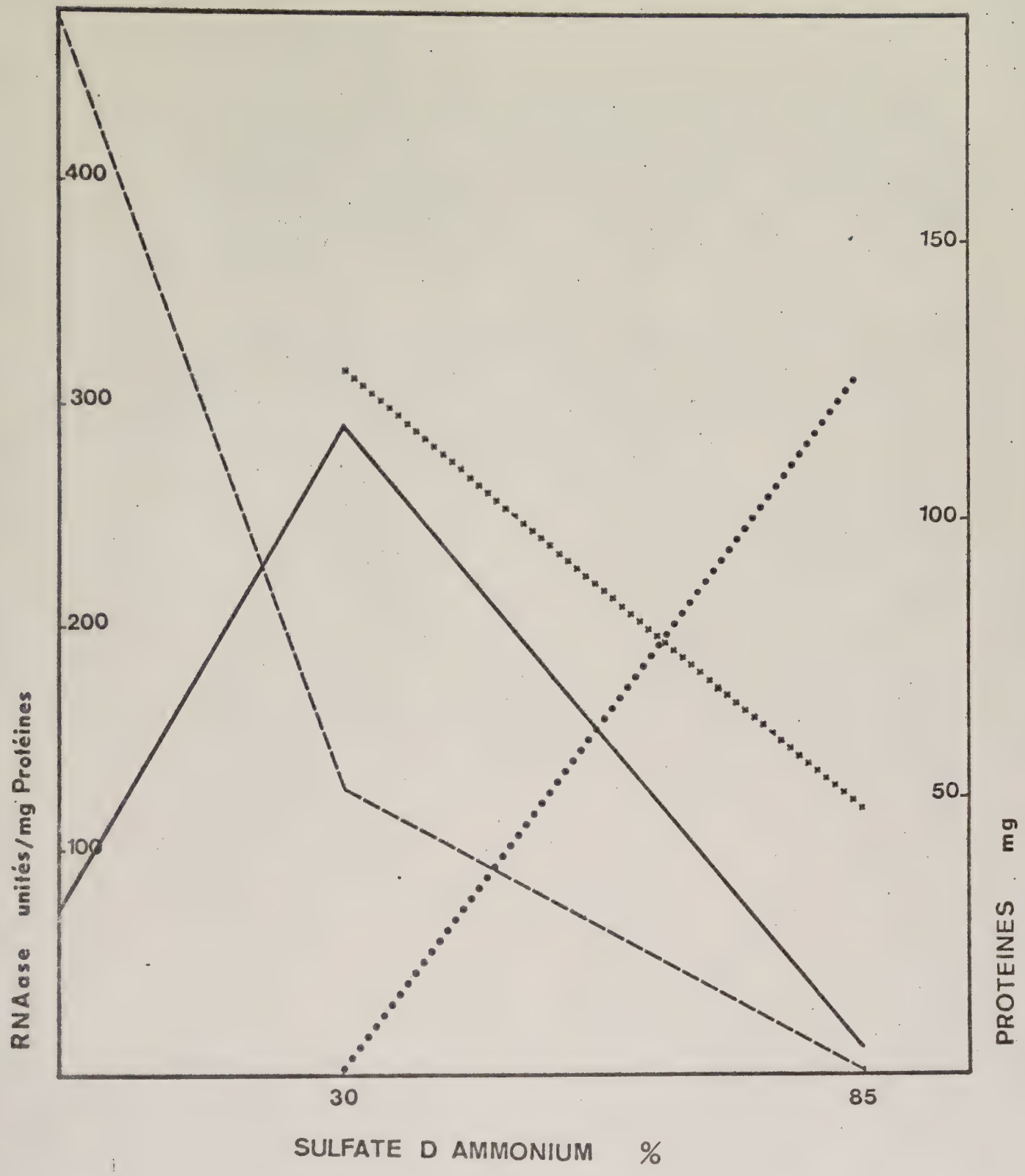


Figure 3: Précipitation fractionnée de l'extrait initial par le sulfate d'ammonium.

L'extrait initial a été porté à 30% de saturation en sulfate d'ammonium. Après précipitation, le surnageant a été amené à 85% de saturation. Les surnageants et les culots (après dissolution sont dialysés contre du citrate de Na 20mM pH 5,5.

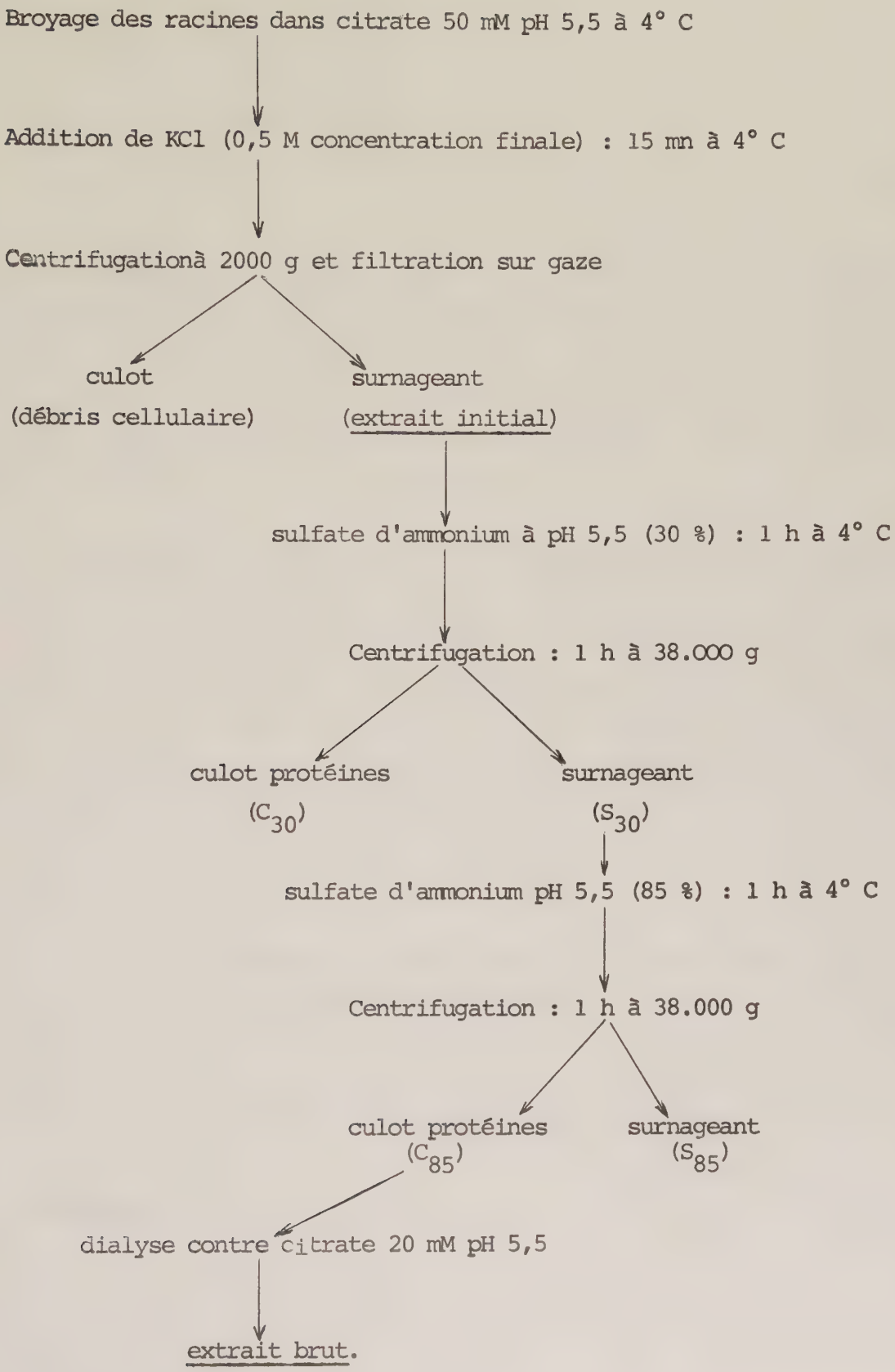
Teneur en protéines: (- - - -) surnageant, (+++++) culot.

Activité spécifique des RNAases à pH5,5: (———) surnageant

(••••) culot.

REDDI d'une part et JERVIS d'autre part utilisent des feuilles de Tabac, où près de 75 % des protéines des feuilles sont d'origine chloroplastique, ZELITCH (56), ce qui pourrait entraîner des différences importantes dans la proportion relative des différentes protéines et des activités ribonucléasiques par rapport à celles présentes dans les racines de Fève.

Cette étude, qui nous a montré la nécessité d'adapter les méthodes d'extraction à chaque matériel biologique, nous a amené à retenir, pour l'extraction des ribonucléases de racines de Fève, le protocole expérimental présenté dans le schéma suivant (voir page 23).


Broyage des racines dans citrate 50 mM pH 5,5 à 4° C
Addition de KCl (0,5 M concentration finale) : 15 mn à 4° C
Centrifugationà 2000 g et filtration sur gaze
culot
(débris cellulaire)
surnageant
(extrait initial)
sulfate d'ammonium à pH 5,5 (30 %) : 1 h à 4° C
Centrifugation : 1 h à 38.000 g
culot protéines
(C30)
surnageant
(S30)
sulfate d'ammonium pH 5,5 (85 %) : 1 h à 4° C
Centrifugation : 1 h à 38.000 g
culot protéines
(C85)
surnageant
(S85)
dialyse contre citrate 20 mM pH 5,5
extrait brut.

C H A P I T R E 2

SEPARATION ET PURIFICATION DES RNAses

Les résultats préliminaires ont mis en évidence (chapitre 1. 1. a) l'existence d'activités nucléolytiques à comportement anionique ou cationique. La démarche expérimentale adoptée a donc été basée sur la séparation initiale de l'extrait brut en protéines à comportement anionique ou cationique, utilisées indépendemment pour l'isolement et la purification des ribonucléases.

1 - SEPARATION DE L'EXTRAIT BRUT EN PROTEINES ANIONIQUES ET CATIONIQUES

Le choix du type d' échangeur a été guidé par des considérations théoriques sur l'utilisation de DEAE-cellulose. En effet, ces celluloses sont des bases et les ions carbonates et bicarbonates ont une grande affinité pour le DEAE-cellulose et risquent de pertuber l'échange ionique des polyelectrolytes. La nécessité d'utiliser des solutions exemptes de CO_2 nous a donc amené à utiliser, pour l'étape initiale de purification, la carboxyméthylecellulose réservant, pour des étapes ultérieures, la cellulose DEAE.

Les courbes de la figure 4 présentent les résultats d'une expérience type et confirment ceux obtenus précédemment (figure 1) : on constate que la majeure partie des protéines et de l'activité ribonucléasique a un comportement de protéine anionique. Les protéines fixées sur la cellulose, protéines cationiques, ont été éluées en bloc au moyen de NaCl 1 M.

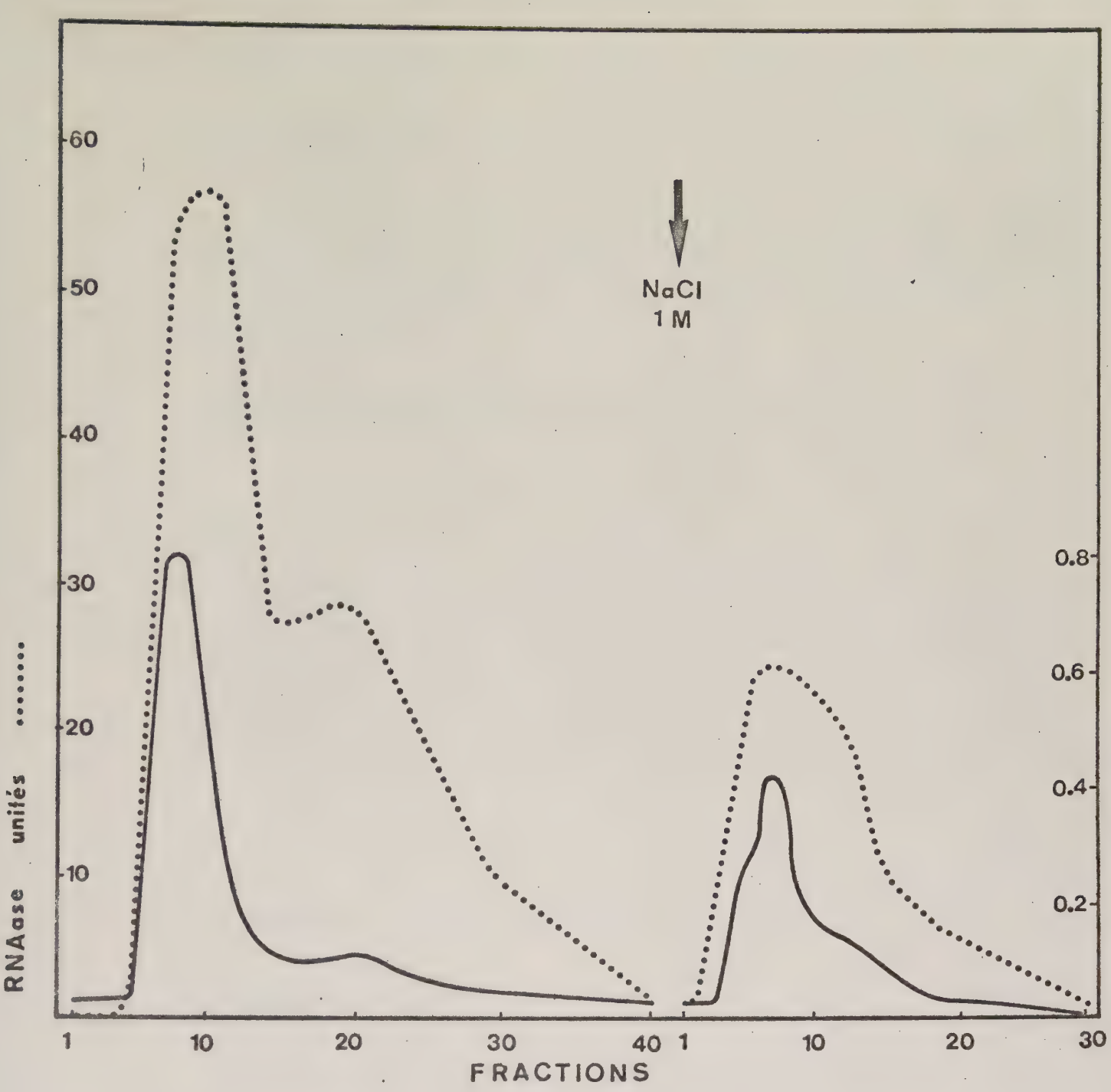


Figure 4: Chromatographie de l'extrait brut sur CM-cellulose.

Volume de l'échantillon: 15 ml (correspondant à 37 g de poids frais de racines); colonne: 2,5x12 cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions : 5 ml; tampon de chromatographie: citrate de Na 20mM pH 5,5; élution des protéines fixées: tampon de chromatographie contenant du NaCl 1M.

2 - NUCLEASES ANIONIQUES

Le problème majeur auquel nous devions faire face était, d'une part, de débarasser les RNAses des contaminants tels que les phosphomonoestérases et surtout les phosphodiestérases, et d'autre part, de séparer les diverses espèces de nucléases.

a) Chromatographie des nucléases anioniques sur CM-cellulose

Dans le but de les séparer, les protéines anioniques ont été soumises à une chromatographie sur CM-cellulose en appliquant un gradient de force ionique. Les courbes de la figure 5 montrent que ces conditions aboutissent à la séparation de trois groupes de protéines à activité hydrolytique. Il apparaît cependant que, dans tous les cas, il existe un mélange entre les activités RNAsiques et phosphoestérasiques, et d'autre part, que le deuxième pic d'activité RNAsique est très étalé. L'importance du pic des phosphodiestérases conduit à envisager que l'activité RNAsique mesurée pourrait être dûe en grande partie à l'action de la phosphodiestérase.

Pour tenter de séparer les activités ribonucléasiques et phosphoestérasiques, un autre type de séparation a été utilisé : la filtration sur gel, la séparation s'effectuant d'après le poids moléculaire.

b) Filtration sur gel

Tenant compte de beaucoup des données de la littérature (3) qui indiquent que le poids moléculaire des RNAses est généralement compris entre 13.000 et 30.000, notre choix tout d'abord s'est porté sur les gels dont la limite d'exclusion est voisine de 40.000. La filtration des RNAses sur Sephadex se traduisant par l'étalement des pics d'activité (5), nous avons utilisé des gels dont la matrice a une composition différente, les Biogels (Biorad).

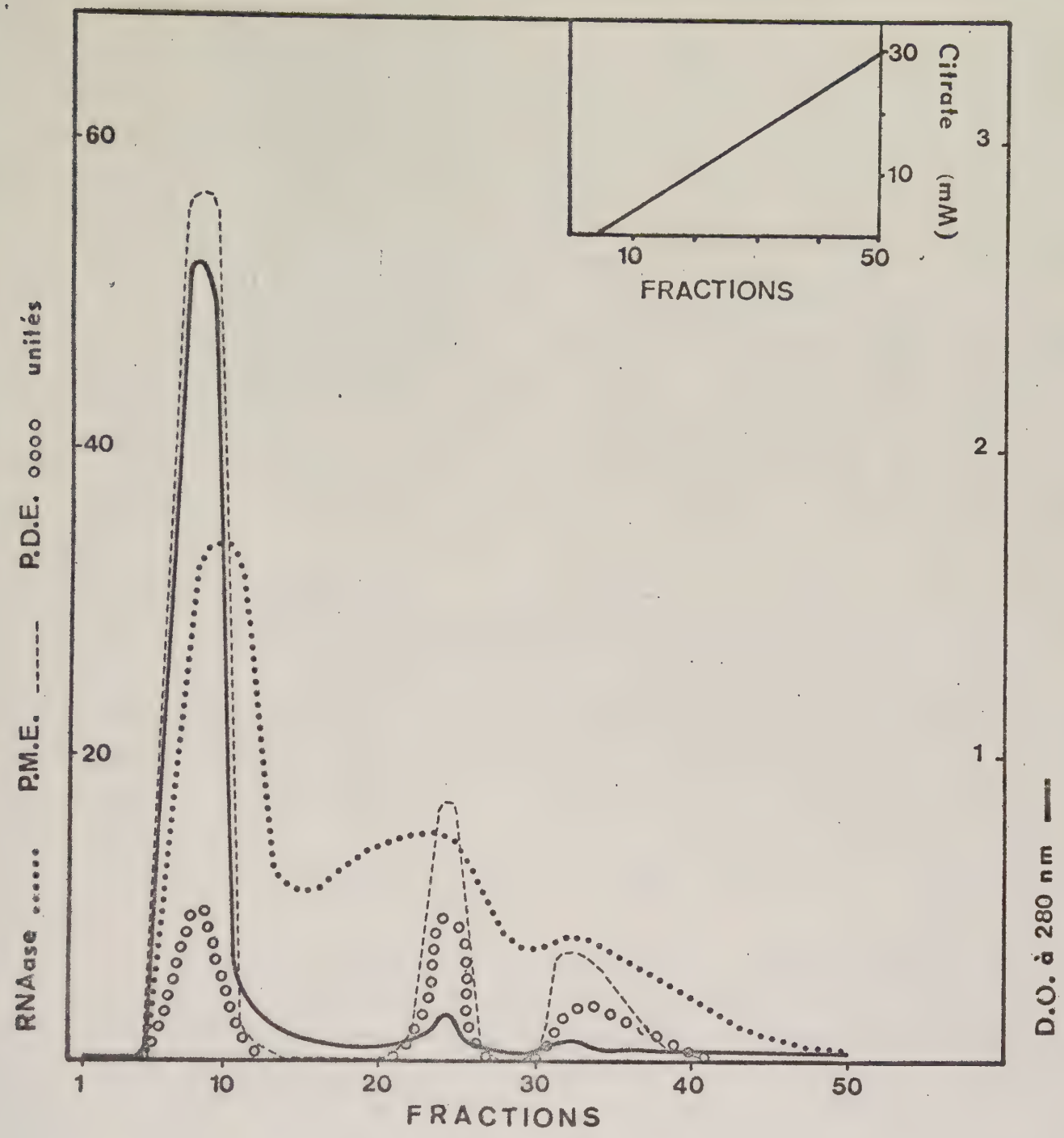


Figure 5: Chromatographie des protéines anioniques de l'extrait brut sur CM-cellulose.

Après une première chromatographie sur CM-cellulose dans des conditions identiques à celles décrites dans la figure 4, les protéines anioniques ont été concentrées contre du citrate de Na 10mM pH 5,5, puis chromatographiées sur CM-cellulose.

Volume de l'échantillon: 15ml (correspondant à 25g de poids frais de racines); colonne: 2,5x12cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; gradient de concentration en citrate de Na de 10 à 30 mM, pH 5,5.

Après étalonnage partiel de la colonne de Biogel P-30 (limite d'exclusion 40.000), présenté dans la figure 6, les protéines cationiques ont été chromatographiées en utilisant du tampon citrate, 20 mM pH 5,5. On constate (figure 7) que la majeure partie des protéines et des phosphomono et phosphodiestérases ont un Kav voisin de 0, ce qui indique donc qu'elles ont un poids moléculaire proche ou supérieur de 40.000. Par contre, les RNAses présentent un pic majeur dont le Kav est voisin de 0,20, ce qui donnerait un poids moléculaire approximatif de 13-15.000. Les courbes de ce graphique montrent que l'on obtient une très bonne séparation des RNAses et des phosphodiestérases et de plus les épaulements visibles sur la courbe de l'activité ribonucléasique suggèrent la présence de plusieurs espèces de nucléases.

c) Chromatographie sur DEAE-cellulose

Les fractions présentant une activité nucléasique et provenant de diverses filtrations sur gel ont été mélangées et après concentration chromatographiées sur DEAE-cellulose, préalablement équilibré en tampon citrate, 10 mM, pH 5,5. L'élution est effectuée par un gradient linéaire de 0 à 0,5 M en NaCl. Les courbes de la figure 8 montrent l'existence de plusieurs fractions actives notées dans l'ordre d'élution : A_α, A_β, A_γ.

A cette étape de purification, il nous a paru nécessaire de vérifier si les activités nucléasiques ainsi individualisées étaient dépourvues d'activité phosphodiestérasique. La mesure de ce type d'activité a été réalisée en utilisant deux substrats :

- le 2'-deoxy-thymidine-3'-p-nitrophényl phosphate, permettant de mettre en évidence les phosphodiestérases, libérant des 3' nucléotides nécessitant un groupement 5'-OH libre (par exemple la P. D. E. de la rate de veau) ;

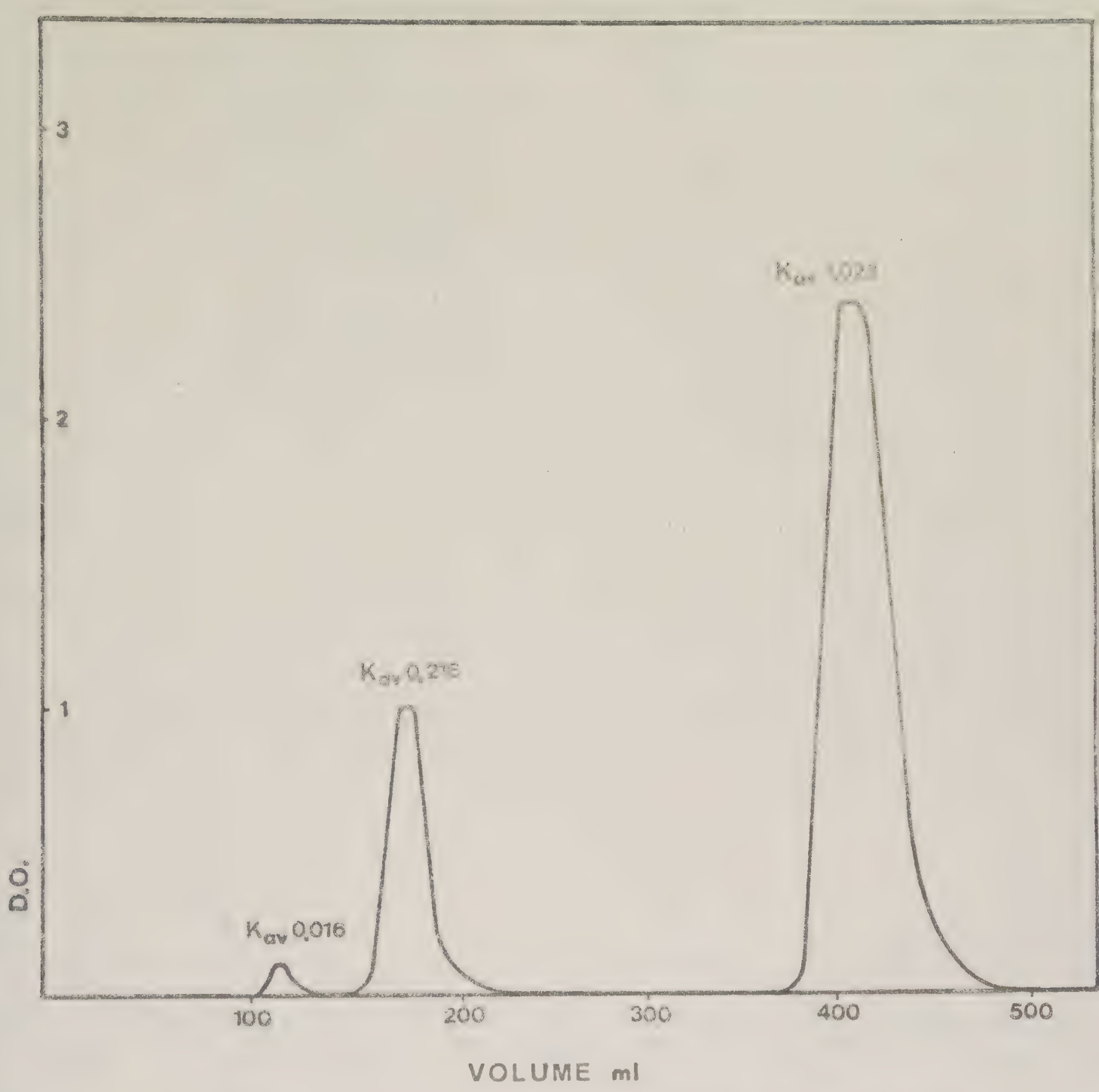


Figure 6: Etalonnage partiel de la colonne de Biogel P30.

L'échantillon déposé contenait 2mg de cytochrome C, 2mg de chromate de K et 2,5mg de Bleu de Dextran, dans un volume de 2ml. Mesures de D.O. à 620nm (bleu de dextran) et à 410nm (cytochrome C, chromate de K). Colonne de 2,5x80cm; débit: 12ml/cm^2/h; tampon: citrate de Na 20mM pH 5,5.

V_e = volume d'élution; V_o = volume d'exclusion (100ml); V_t = volume total du gel (400ml).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

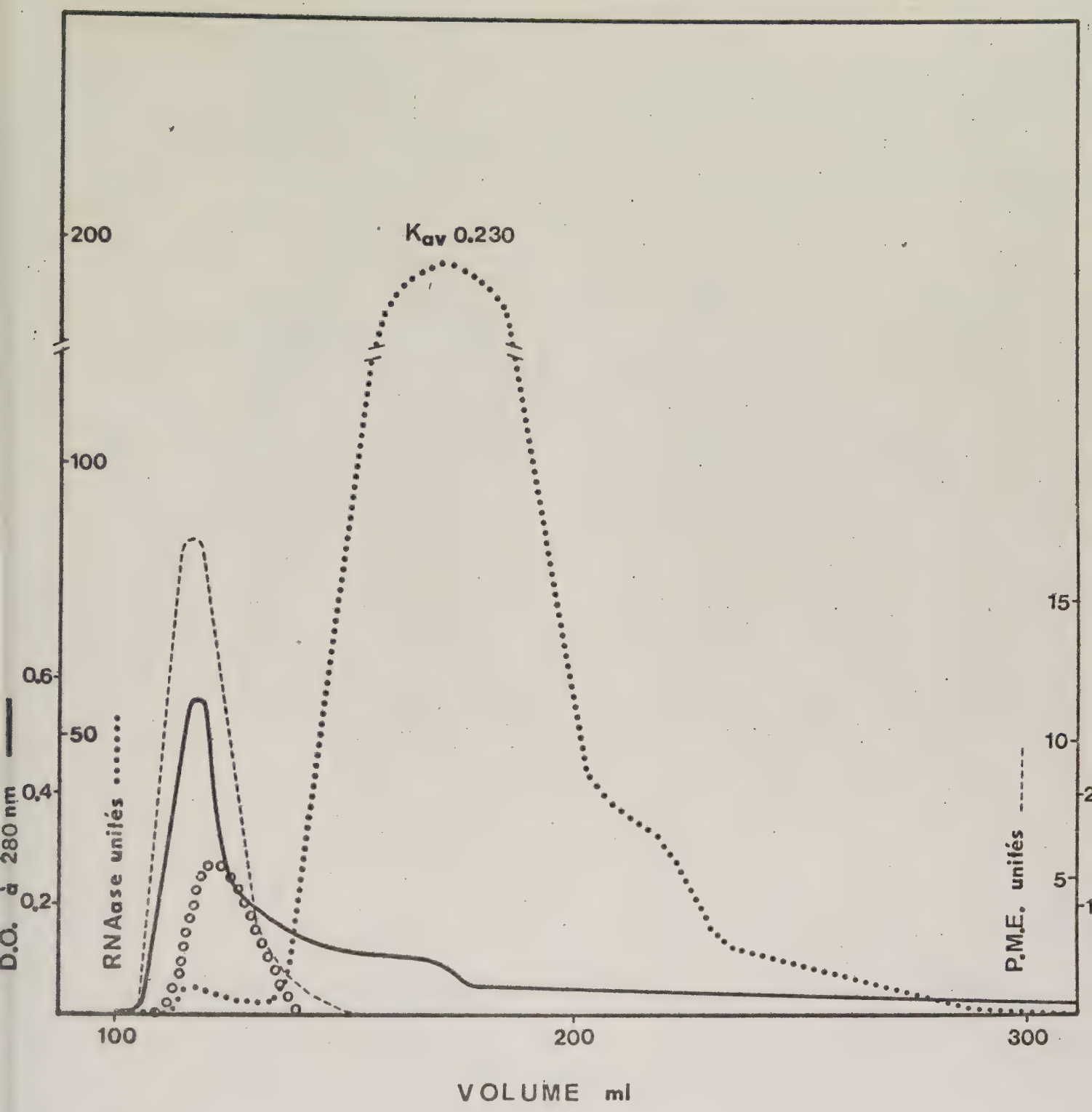


Figure 7: Filtration sur Biogel P30 des protéines anioniques. Volume de l'échantillon: 5,2ml (correspondant à 45g de poids frais de racines); colonne: 2,5x80cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: citrate de Na 20mM pH 5,5.

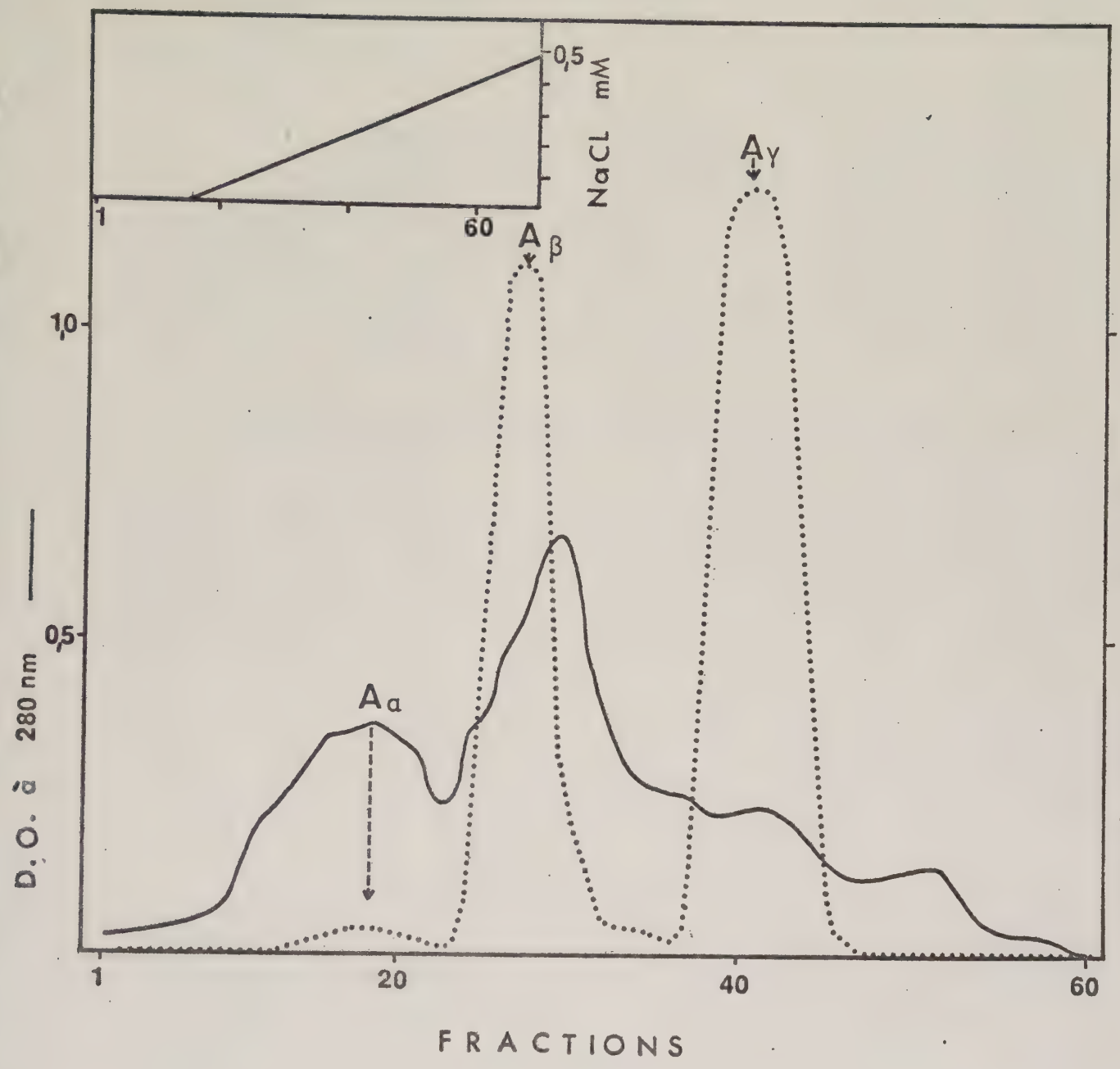


Figure 8: Chromatographie des nucléases anioniques sur DEAE-cellulose.

Volume de l'échantillon: 60ml (correspondant à 730g de poids frais de racines); colonne: 2,5x15cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: citrate de Na 10mM pH 5,5; gradient en NaCl de 0 à 0,5 M.

- le 2'-deoxy-thymidine-5'-p-nitrophényl phosphate, permettant de mettre en évidence les phosphodiestérases, libérant des 5' nucléotides donc impliquant un groupement 3'-OH libre (par exemple le P. D. E. du venin de serpent).

Les résultats obtenus montrent que de ces 3 fractions seule $A\alpha$ présente une activité phosphodiestérasique. Celle-ci est du type 5'-phosphodiestérase et elle est équivalente à 0,25 µg/ml de la phosphodiestérase du venin de serpent. Tenant compte du fait que la fraction A_α contient une quantité importante de protéines, une très faible activité RNAsique et une activité P. D. E., nous n'en avons pas poursuivi l'étude.

d) Etude de l'homogénéité des fractions A_β et A_γ

Les fractions A_β et A_γ après concentration et dialyse sont indépendamment rechromatographiées sur DEAE-cellulose en utilisant des gradients linéaires en NaCl respectivement de 0 à 0,2 M et de 0,1 à 0,5 M. Les figures 9 et 11 présentent les résultats obtenus.

L'examen de la figure 9 montre que l'on obtient, à partir de la fraction A_β, deux pics d'activité nucléasique quantitativement très différents. Ces deux fractions sont notées A_1 et A_2 selon leur ordre d'élution qui correspond à des concentrations en NaCl 0,04 M pour A_1 et 0,1 M pour A_2.

Des tentatives de purification de la fraction A_1, en utilisant des gradients de force ionique, s'étant avérées vaines, nous avons réalisé une chromatographie sur DEAE-cellulose en se plaçant dans des conditions limites d'utilisation de la DEAE-cellulose : équilibration par du tampon citrate 5mM, pH 4,8. Le résultat obtenu, en appliquant pour l'élution un gradient de pH de 4,8 à 6,0 et de concentration en citrate de 5 à 30 mM, conduit aux courbes de la figure 10.

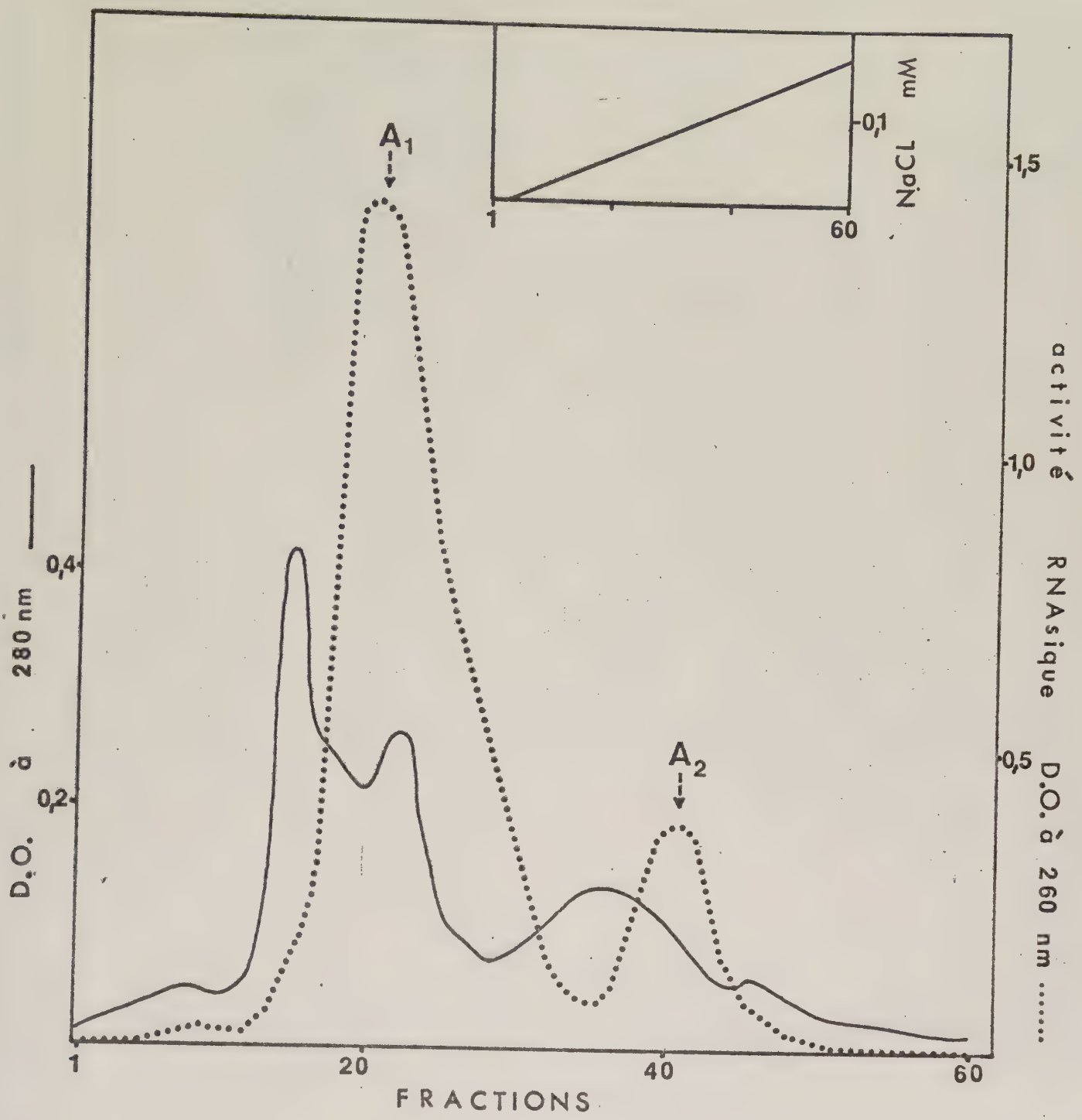


Figure 9: Chromatographie de la fraction $A_{1,2}$ sur DEAE-cellulose. Volume de l'échantillon: 8ml (provenant de la concentration des fractions constituant la fraction Aβ de la figure 8); colonne: 2,5x15cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: citrate de Na 10mM pH 5,5; gradient en NaCl de 0 à 0,2M.

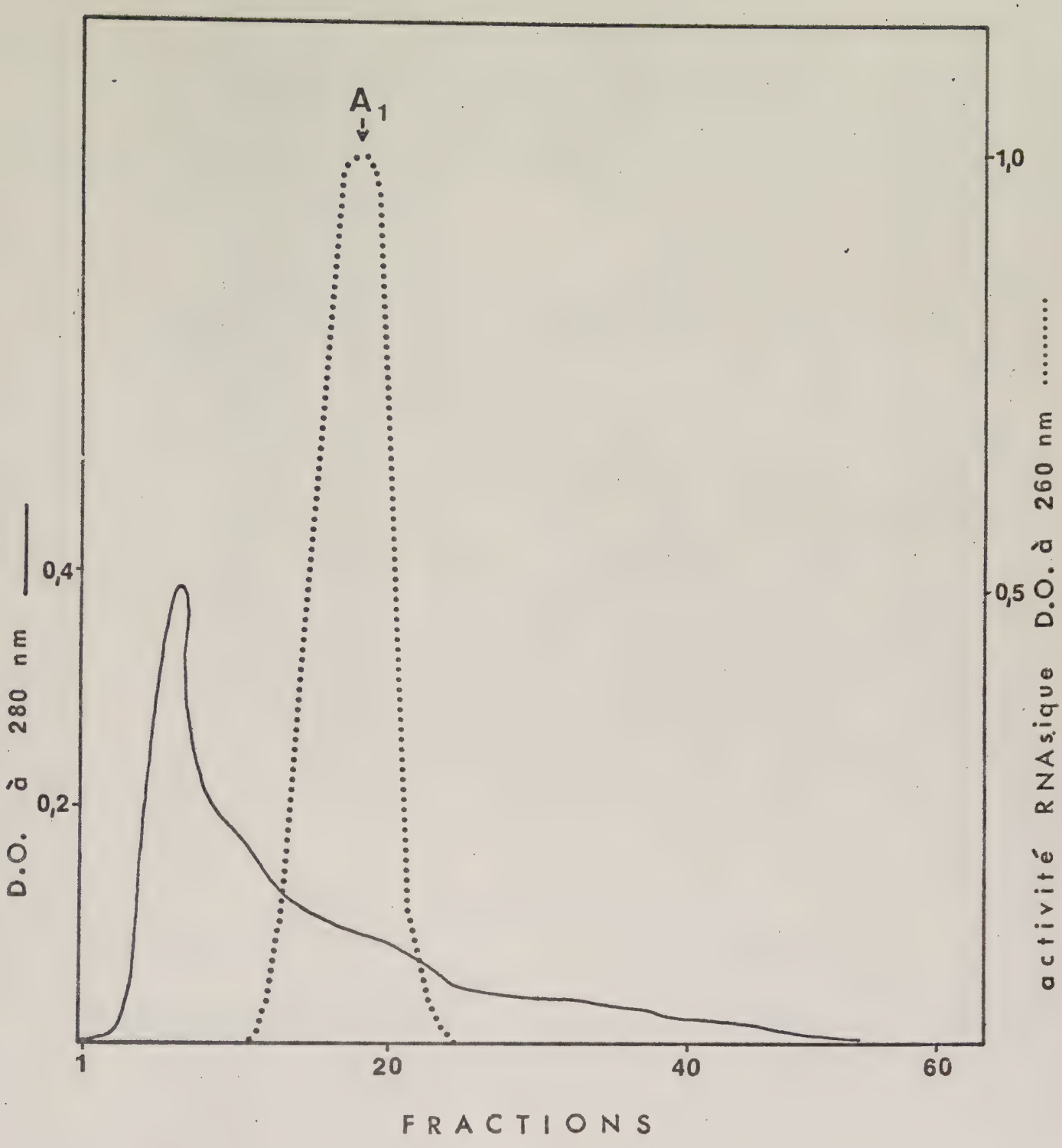


Figure 10: Chromatographie de la fraction A_1 sur DEAE-cellulose. Volume de l'échantillon: 5ml (provenant de la concentration des fractions constituant la fraction A_1 de la figure 9); colonne: 1x15cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: citrate de Na 5mM pH 4,8; gradient de pH de 4,8 à 6,0 et de concentration en citrate de 5 à 30 mM.

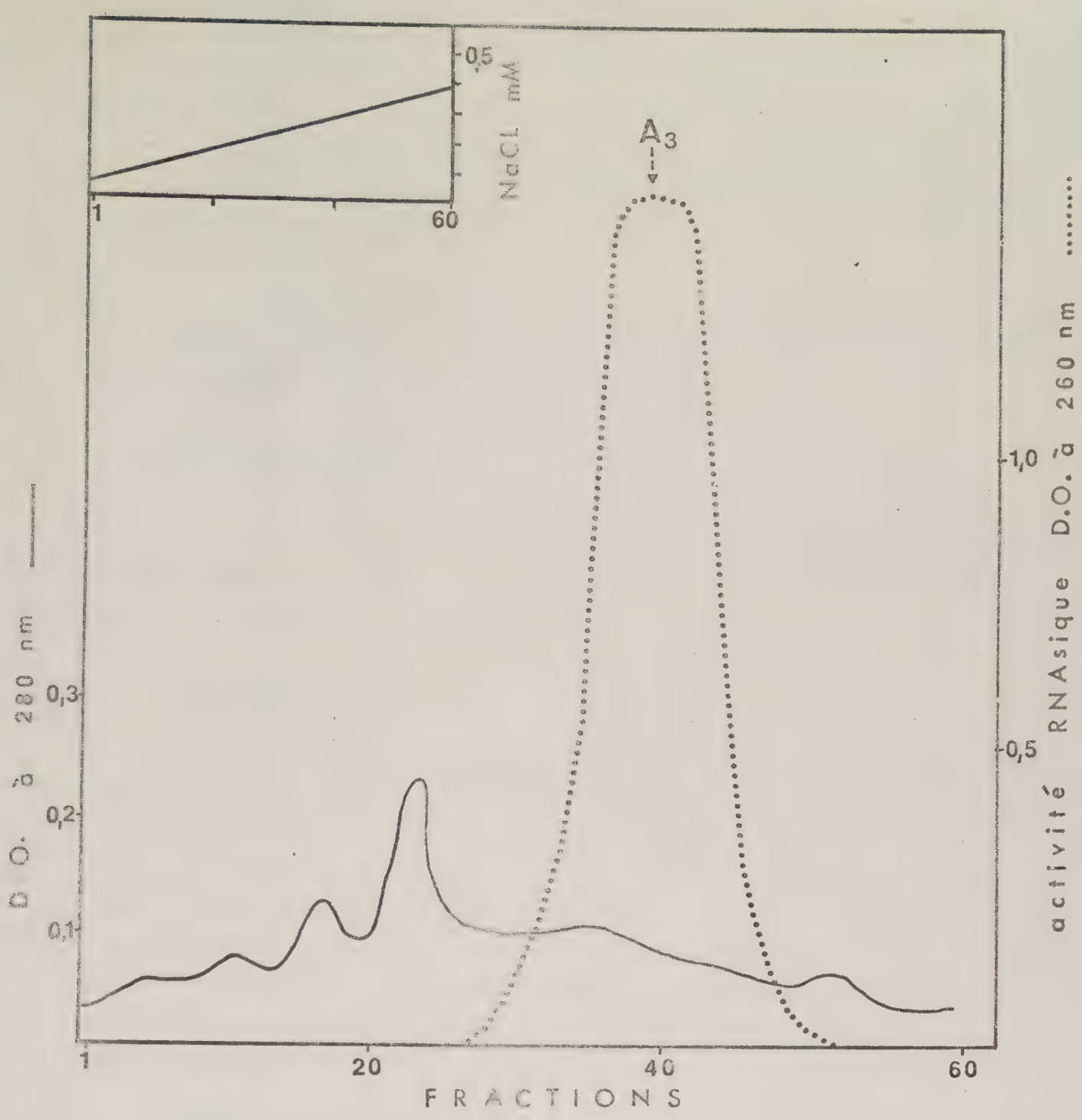


Figure 11: Chromatographie de la fraction A_3 sur DEAE-cellulose. Volume de l'échantillon: 5,5ml (provenant de la concentration des fractions constituant la fraction A_3 de la figure 8); colonne: 2,5x15cm; débit: 12 ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: citrate de Na 10mM pH 5,8; gradient en NaCl de 0,1 à 0,5 M.

Les courbes de la figure 11 montrent que la fraction A_γ, ne contient qu'un seul pic d'activité, noté de maintenant A_3, débarassé de la majeure partie des protéines contaminantes.

L'ensemble de ces résultats nous permettent d'envisager dans le groupe des protéines anioniques, l'existence de 3 activités ribonucléolytiques distinctes, notées A_1, A_2, A_3.

3 - NUCLEASES CATIONIQUES

Pour l'étude des nucléases cationiques, nous avons appliqué la même démarche que celle utilisée pour les enzymes anioniques : filtration sur gel, puis chromatographie sur échangeur d'ions.

a) Filtration sur gel

La filtration sur Biogel P-30 montre (figure 12) que les résultats sont beaucoup moins satisfaisants que ceux obtenus dans le cas des nucléases anioniques. En effet, les activités ribonucléasiques sont mal séparées des activités phosphomonostérasiques. D'après le calcul des Kav, on constate que les nucléases cationiques auraient un poids moléculaire supérieur à celui des anioniques ; il serait compris entre 15.000 et 35 à 40.000 daltons. Ces résultats nous ont conduits à chromatographier les protéines cationiques sur gel P-60 (limite d'exclusion : 60.000 daltons). Les courbes de la figure 13 prouvent que la séparation est alors fort correcte.

b) Chromatographie sur CM-cellulose

Les fractions présentant une activité nucléasique et provenant de diverses filtrations sur gel, ont été mélangées et après concentration chroma-

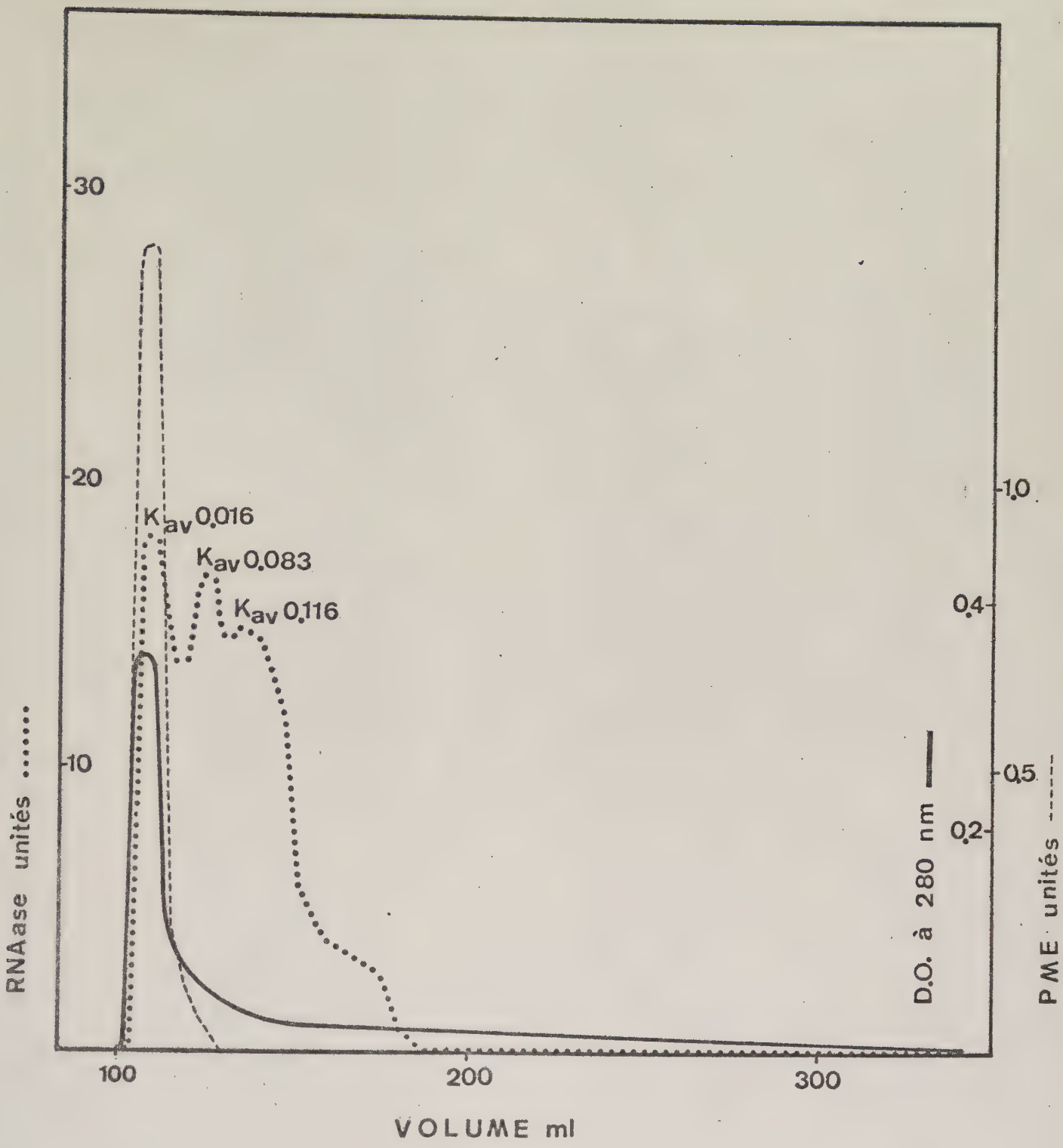


Figure 12: Filtration sur Biogel P30 des protéines cationiques. Volume de l'échantillon: 6,5ml (correspondant à 45g de poids frais de racines); colonne: 2,5x80cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: phosphate de Na 80mM pH 7,5.

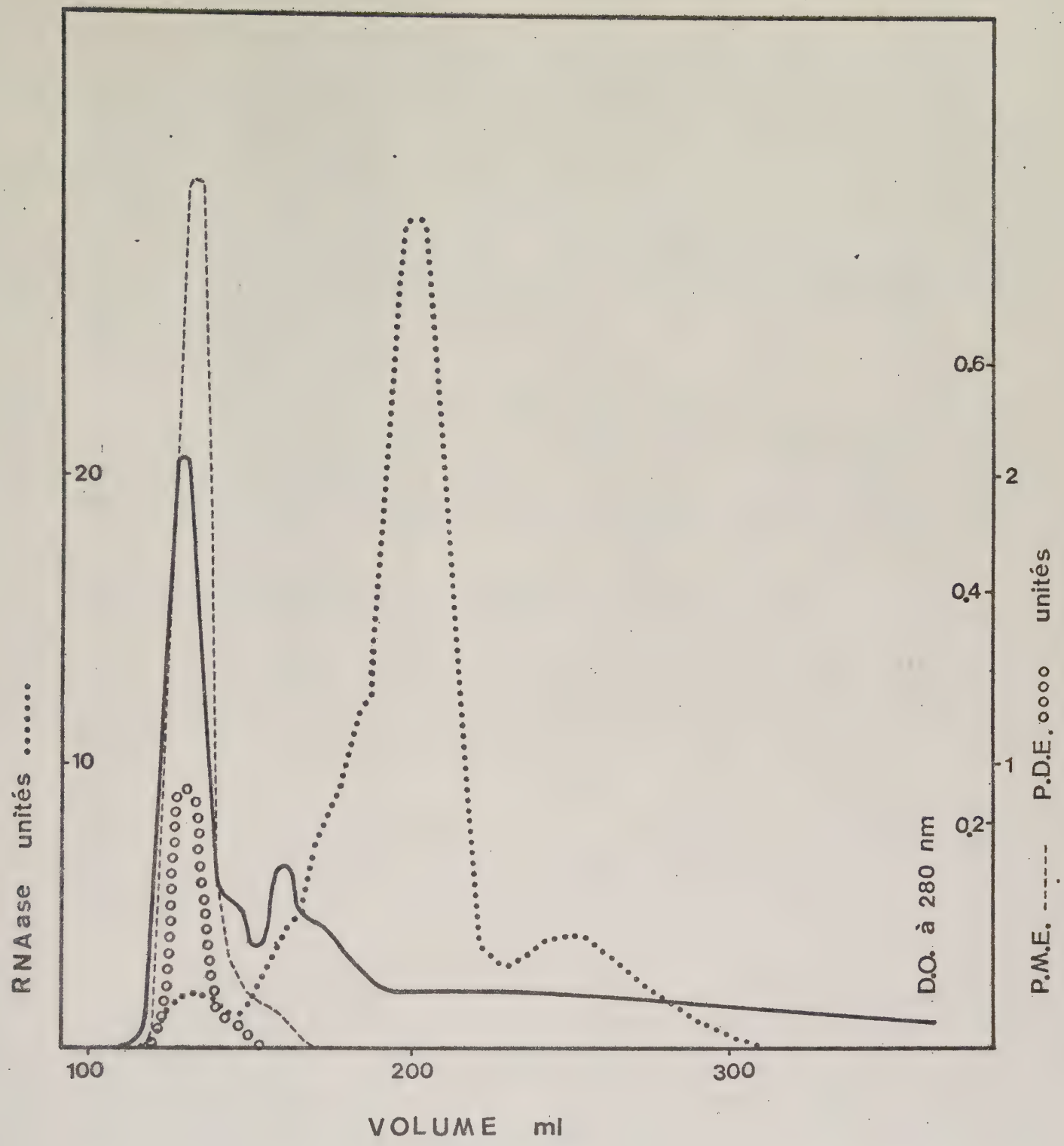


Figure 13: Filtration sur Biogel P60 des protéines cationiques.

Volume de l'échantillon: 6ml (provenant de la concentration des fractions à activité RNAasique de la figure 12); colonne: 2,5x86 cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: phosphate de Na 80mM pH 5,5.

tographiées sur CM-cellulose, équilibrées par tampon phosphate, 10 mM, pH 6,0. L'élution effectuée par un gradient linéaire en KCl de 0 à 0,6 M, conduit aux courbes de la figure 14. Elles indiquent l'existence de 3 fractions à activité nucléolytique : la fraction, notée X, qui n'est pas fixée sur la CM-cellulose, dans ces conditions expérimentales, et qui aurait donc un comportement de protéines anioniques ; les fractions notées C_α, C_β, éluées respectivement par du KCl 0,16 M et 0,32 M.

Pour vérifier si ces fractions sont ou non contaminées par des activités phosphodiestérasiques, des mesures identiques à celles réalisées dans le cas des nucléases anioniques (chapitre 2, 2. c.) ont été effectuées. Aucune de ces trois fractions ne présente d'activité phosphodiestérasique détectable.

c) Etude de l'homogénéité des fractions C_α et C_β

Les fractions C_α et C_β, après concentration et dialyse, sont chromatographiées indépendamment sur CM-cellulose en utilisant des combinaisons de gradients continus et discontinus en KCl.

La chromatographie de la fraction C_α (figure 15) a permis d'individualiser un pic d'activité majeure, élué à une concentration en KCL de 0,16 M et noté C_1. Notons que la fraction C_α contient en outre des protéines à comportement "anioniques" (fraction X) et un reliquat de la fraction C_β.

D'après les courbes de la figure 16, il apparaît que la fraction C_β est contaminée par des protéines à comportement "anionique" (fraction X) et par la fraction C_1 (éluée à 0,16 M en KCl). Elle contient un pic d'activité majeur noté C_2 et élué entre 0,17 et 0,52 M en KCl. Il faut noter que cette activité C_2 semble comprendre deux composants, dont un mineur, qu'il n'a pas été possible de séparer.

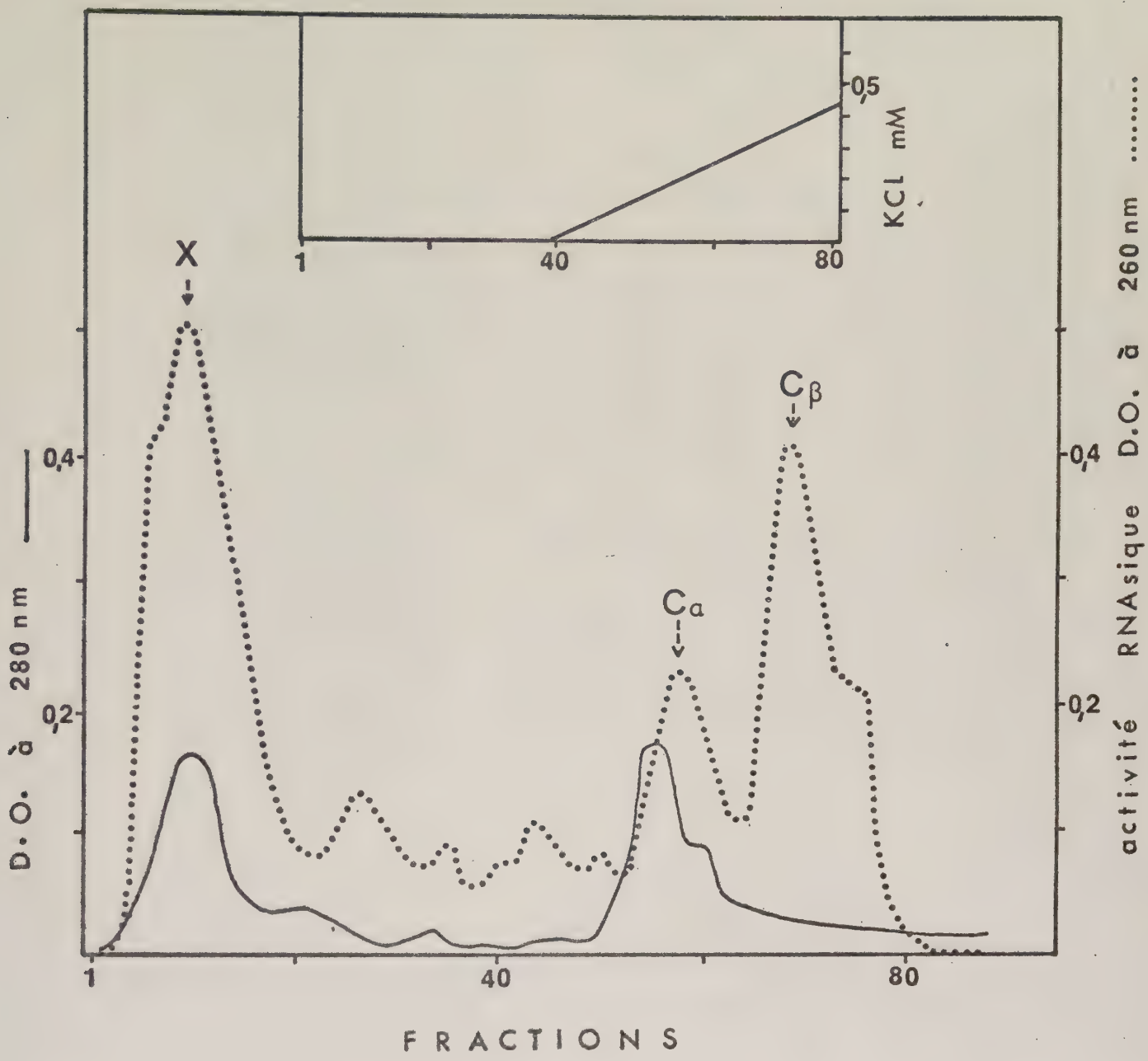


Figure 14: Chromatographie des protéines cationiques sur CM-cellulose.

Volume de l'échantillon: 41ml (correspondant à 285g de poids frais de racines); colonne: 1x38cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: phosphate de Na 10mM pH 6,0; gradient en KCl de 0 à 0,6M.

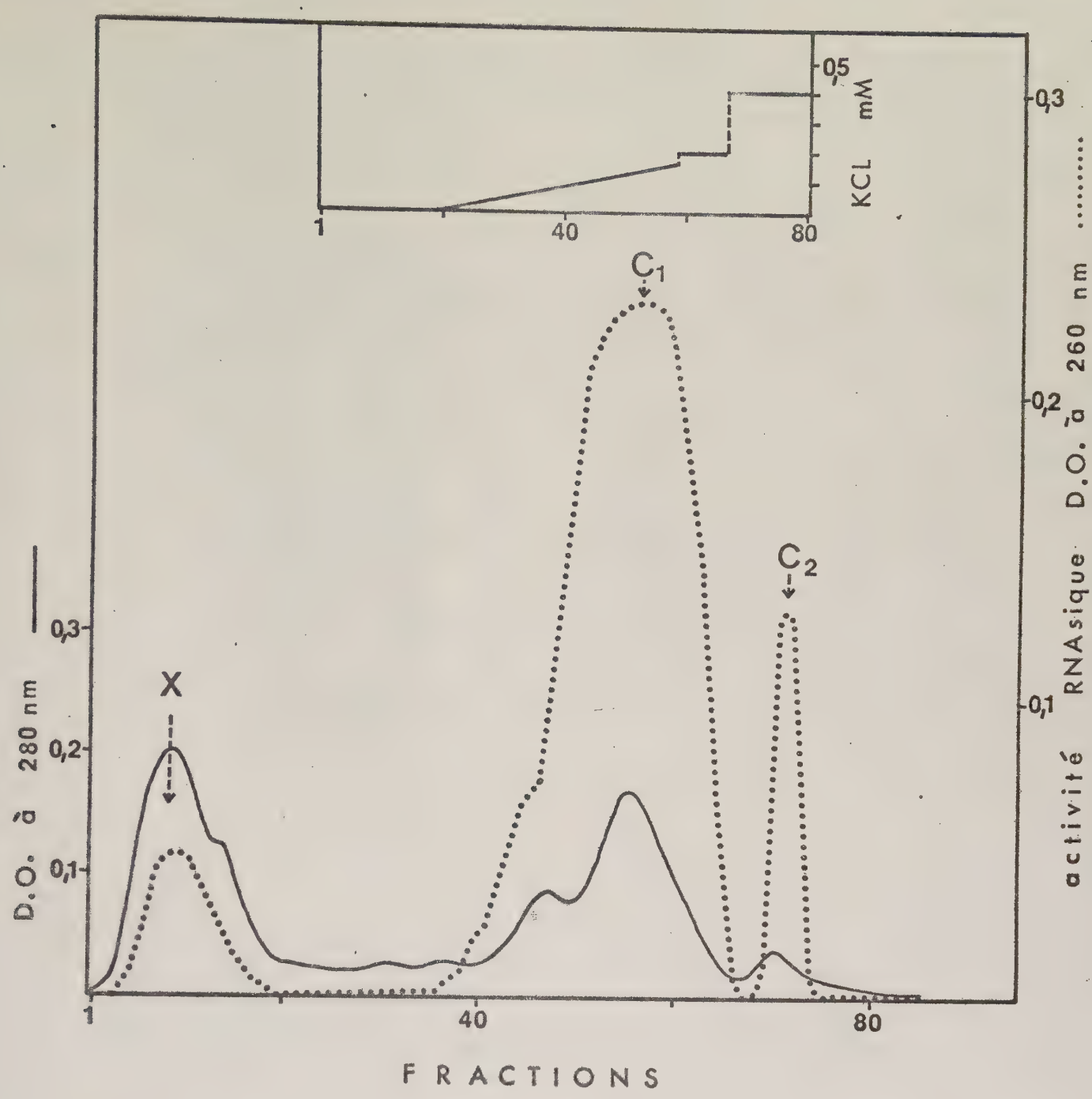


Figure 15: Chromatographie de la fraction C_a sur CM-cellulose. Volume de l'échantillon: 31ml (provenant de la concentration des fractions constituant la fraction C_a de la figure 14); colonne: 1x20cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions : 5ml; tampon: phosphate de Na 10mM pH 6,0; gradient continu en KCl de 0 à 0,17M (fractions 18 à 58) puis discontinu: KCl 0,2M (fractions 59 à 68) et KCl 0,4M (fractions 69 à 80).

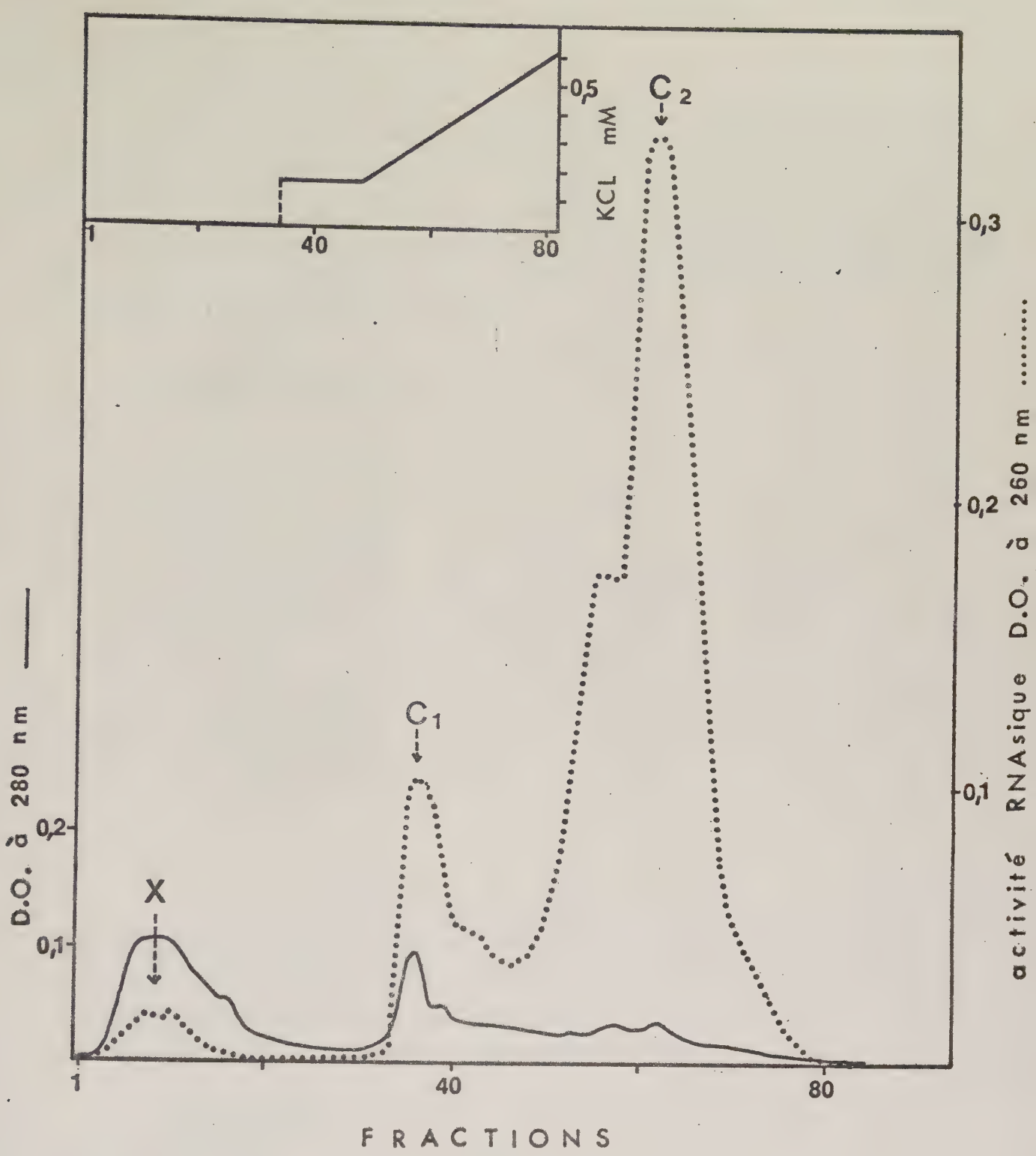


Figure 16: Chromatographie de la fraction C_β sur CM-cellulose. Volume de l'échantillon: 41ml (provenant de la concentration des fractions constituant la fraction C_β de la figure 14); colonne: 1x30cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5 ml; tampon: phosphate de Na 10mM pH 6,0; l'élution est réalisée en utilisant du KCl 0,16M (fractions 31 à 46) puis un gradient continu en KCl de 0,16 à 0,7M (fractions 47à 90).

Il nous semble intéressant de noter que cette étude de la fraction cationique fait apparaître la présence d'espèces à caractère éventuellement anionique (fraction X). Cependant, le fait que ces protéines "anioniques" apparaissent constamment lors des chromatographies successives sur CM-cellulose, est assez curieux ; l'analyse plus précise de leur comportement vis-à-vis des échangeurs d'ions a donc été entreprise.

4 - ETUDE DU COMPORTEMENT DES FRACTIONS X

Les fractions notées "X" ont été, après mélange et concentration, chromatographiées sur colonne de DEAE-cellulose, équilibrée avec du tampon citrate 10 mM pH 5,5, l'élution étant effectuée par un gradient en KCl de 0 à 0,5 M. Les courbes de la figure 17 confirment le comportement anionique de l'activité enzymatique présente dans cette fraction. Cette activité nucléolytique, étalée tout au long de la chromatographie ne semble pas correspondre à l'une des enzymes anioniques isolées. Des tentatives pour individualiser le ou les activités présentes dans cette fraction ont été négatives et il n'a pas été possible d'en poursuivre l'étude.

5 - CONCLUSION

La démarche expérimentale que nous avons suivie et dont un point très important est la séparation des protéines extraites en deux groupes à comportement anionique ou cationique, a donc permis l'isolement de cinq activités ribonucléasiques . Pour apprécier le degré de purification atteint, les résultats d'une expérience type sont résumés dans le tableau IV.

Il apparaît que les protéines qui ont atteint le stade de purification le plus poussé sont les fractions A_1 et A_3. Cette conclusion est renforcée par les résultats (figure 18) d'une séparation par électrofocalisation.

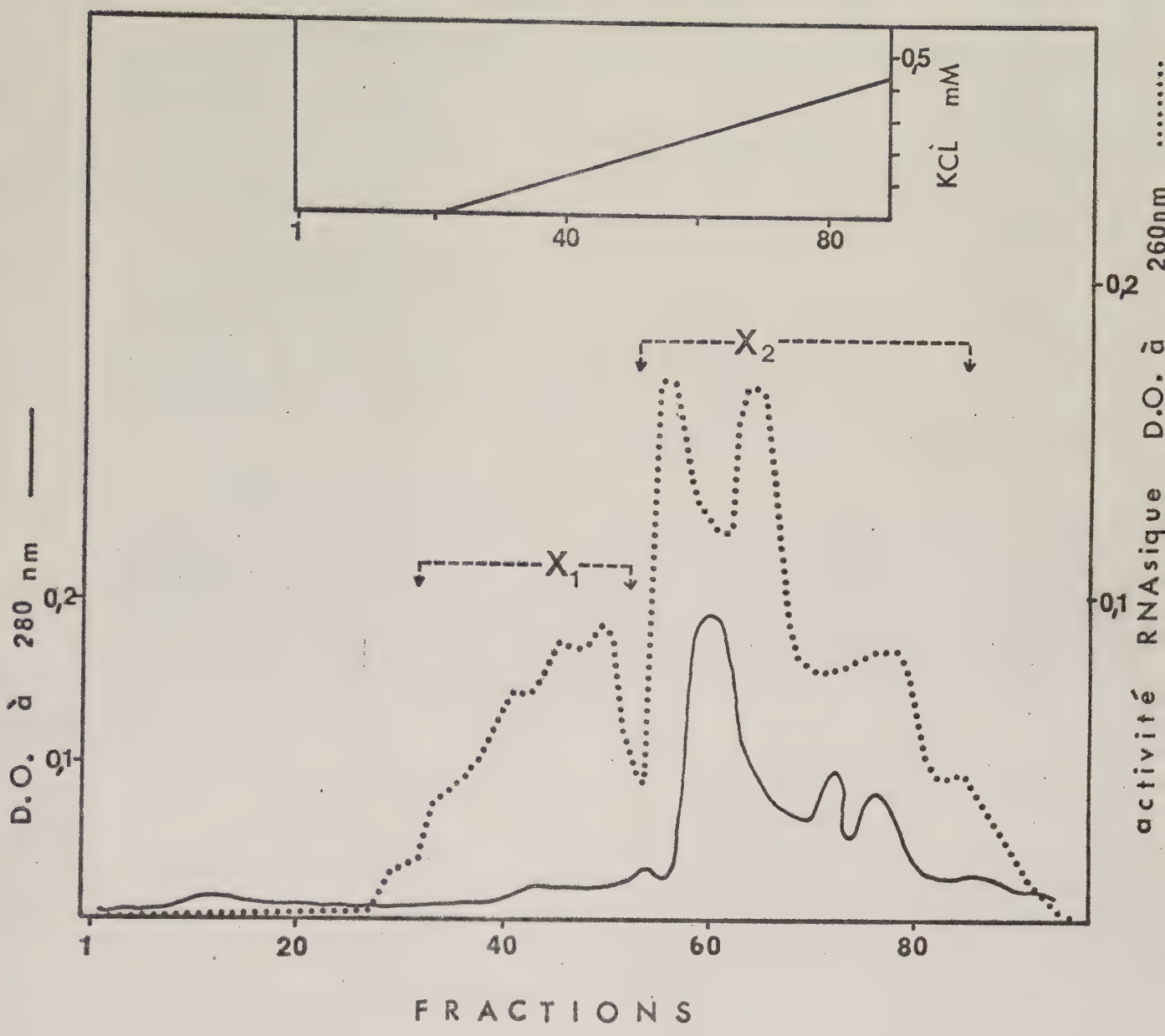


Figure 17: Chromatographie des fractions X sur DEAE-cellulose. Volume de l'échantillon: 50ml (provenant de la concentration des fractions X, obtenues dans les figures 14, 15 et 16); colonne: 1x30 cm; débit: 12ml/cm^2/h; volume des fractions: 5ml; tampon: citrate de Na 10mM pH 5,5; gradient en KCl de 0 à 0,5M.

Etape	Volume ml	Protéines totales mg	Activité totale Unités	Rendement %	Activité spésifique U/mg	Facteur de purification
Extrait initial	132	2234	20200	100	9	1
Extrait brut	94	493	19800	98	40	4,4
Chromatographie sur CM_52						
RNAses anioniques	15	250	13760	68	55	6,0
RNAses cationiques	16	150	5100	25	34	3,7
Filtration sur Bio-Gel						
RNAses anioniques	45	20,4	11880	58	583	64,7
RNAses cationiques	42	12,4	2300	11	186	20,6
Chromatographie sur DEAE_52						
A_1	8	0,82	860	4,2	1049	116,5
A_2	8	1,45	200	1	138	15,3
A_3	7	0,88	6200	30,6	7045	782,8
Chromatographie sur CM_52						
C_1	7	1,77	110	0,5	62	6,9
C_2	6	0,33	150	0,7	454	50,4

Tableau IV: Purification des "ribonucléases" extraites de racines de Fève.

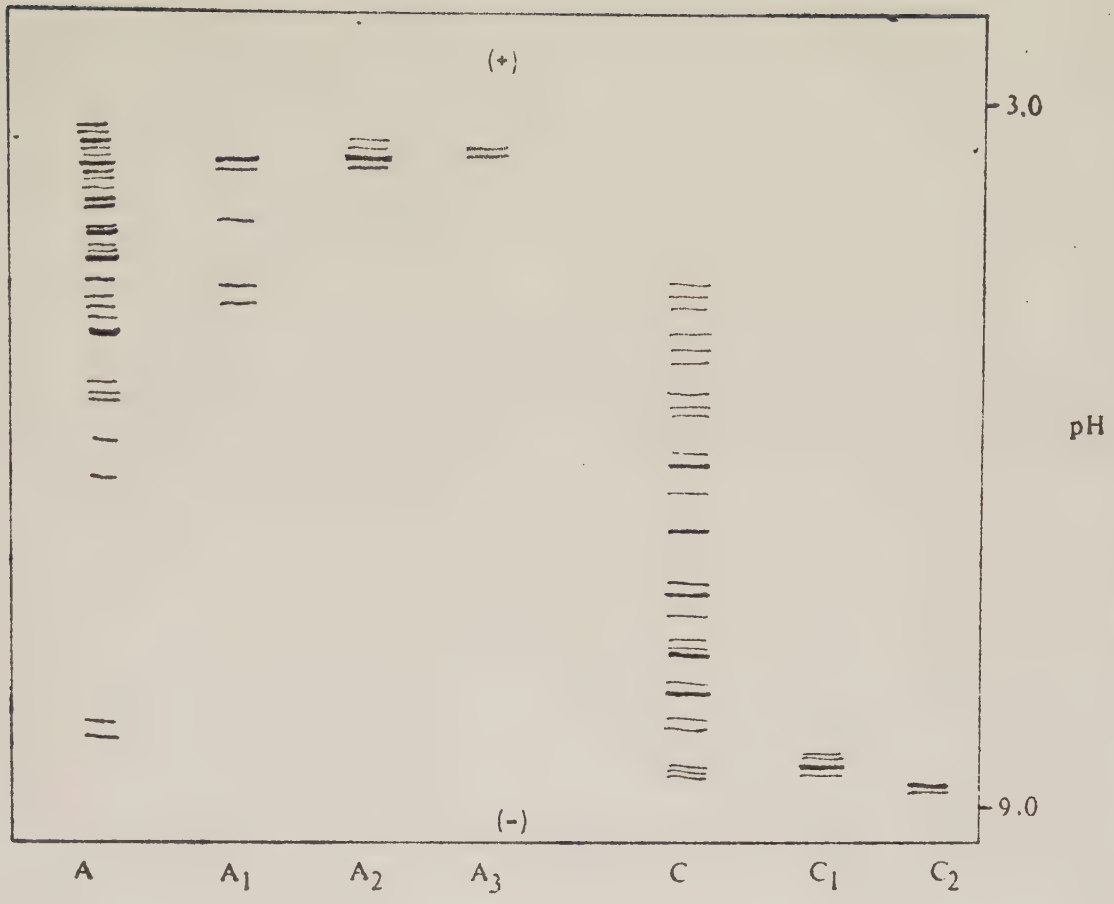


Figure 18: Séparation par électrofocalisation des protéines et enzymes isolées.

Les protéines anioniques (A) et cationiques (C), séparées par chromatographie sur CM-cellulose, ainsi que les enzymes isolées de ces fractions (A_1,A_2,A_3 et C_1,C_2) ont été soumises à une électrofocalisation en utilisant des "Ampholine PAGplate,L.K.B."; échelle du pH: 3,0 à 9,0. Les protéines ont été colorées par le bleu de coomasie.

Cette expérience permet en outre de confirmer l'exactitude de la séparation en protéines anioniques et cationiques. Il apparaît en effet que les protéines A_1, A_2, A_3 sont localisées dans la zone des pH inférieurs à 4,0 alors que les C_1 et C_2 ont arrêté leur migration dans des zones dont le pH est supérieur à 6,0.

Bien que les protéines A_2 et C_1 soient relativement contaminées, les faibles quantités d'activité présentes ne nous ont pas permis d'en poursuivre la purification. Nous avons cependant analysé les propriétés en même temps que celles des autres enzymes.

D E U X I E M E P A R T I E

P R O P R I E T E S G E N E R A L E S E T M O D E D ' A C T I O N

D E S R I B O N U C L E A S E S D E R A C I N E D E F E V E

CHAPITRE 1

PROPRIETES GENERALES

1 - DETERMINATION DU pH OPTIMUM

La détermination de l'activité ribonucléasique a été effectuée en utilisant des tampons citrate 10 mM pour les pH compris entre 4,4 et 6,2 et phosphate 10 mM pour les pH compris entre 5,8 et 8,0. Le tableau V présente les résultats obtenus. Si les pH optima des enzymes anioniques sont relativement groupés dans la même zone (entre 5,8 et 6,4), ceux des deux enzymes cationiques sont nettement séparés : 6,2 pour C_1 et 7,2 pour C_2.

2 - CARACTERISTIQUES CINETIQUES DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les courbes d'activité ribonucléolytique en fonction du temps d'incubation à 35° C et de la concentration en enzyme sont présentées dans la figure 19. Elles permettent de déterminer les durées d'incubation correspondant aux conditions de vitesse initiale ; ces durées sont comprises entre 10 et 30 mn suivant l'enzyme étudiée.

Les courbes de la figure 20 présentent les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en enzyme. Il apparaît que la vitesse initiale est proportionnelle à la concentration dans le cas des activités A_1 et A_3. Par contre pour les enzymes A_2, C_1 et C_2, les courbes qui paraissent linéaires dans la gamme de concentration étudiée, ne passent par

	Phosphate 10 mM										
pH	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	8,0
A_1	100	91	86	85	83	80	67	—	—	—	—
A_2	90	95	100	95	67	59	52	—	—	—	—
A_3	72	78	90	100	83	71	64	52	30	—	—
C_1	80	87	100	90	83	80	72	69	52	30	22
C_2	46	61	67	70	75	83	98	100	96	73	68

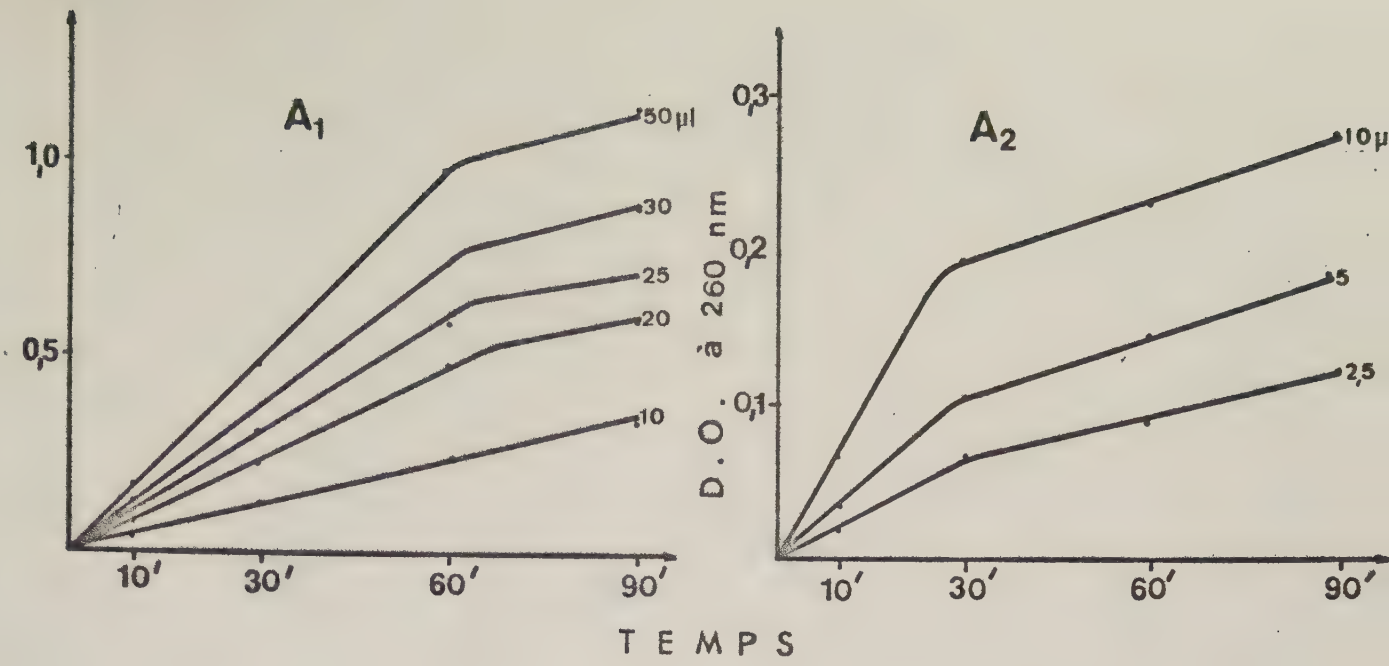
	Citrate 10 mM						
pH	4,4	4,8	5,2	5,6	5,8	6,0	6,2
A_1	23	33	65	83	100	94	80
A_2	29	45	57	72	83	90	100

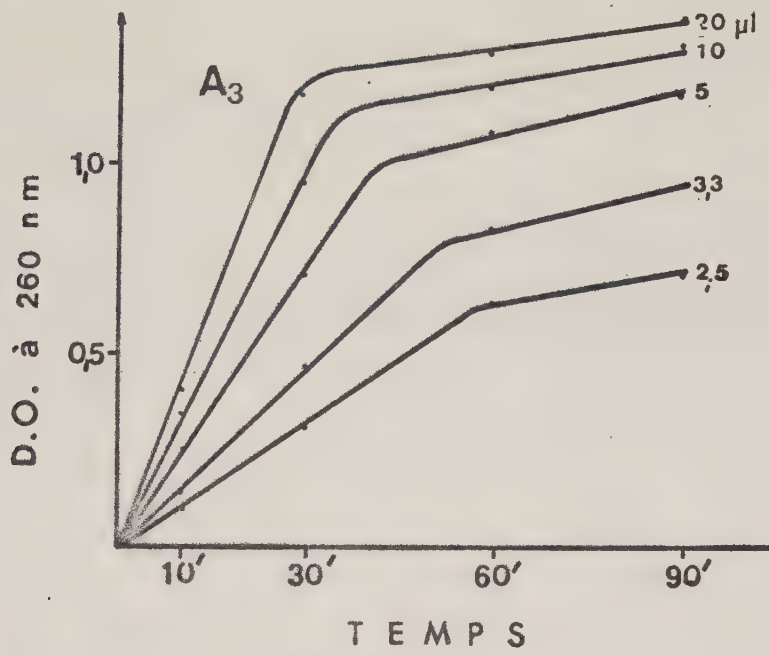
Tableau V: Influence du pH sur l'activité des diverses enzymes isolées.

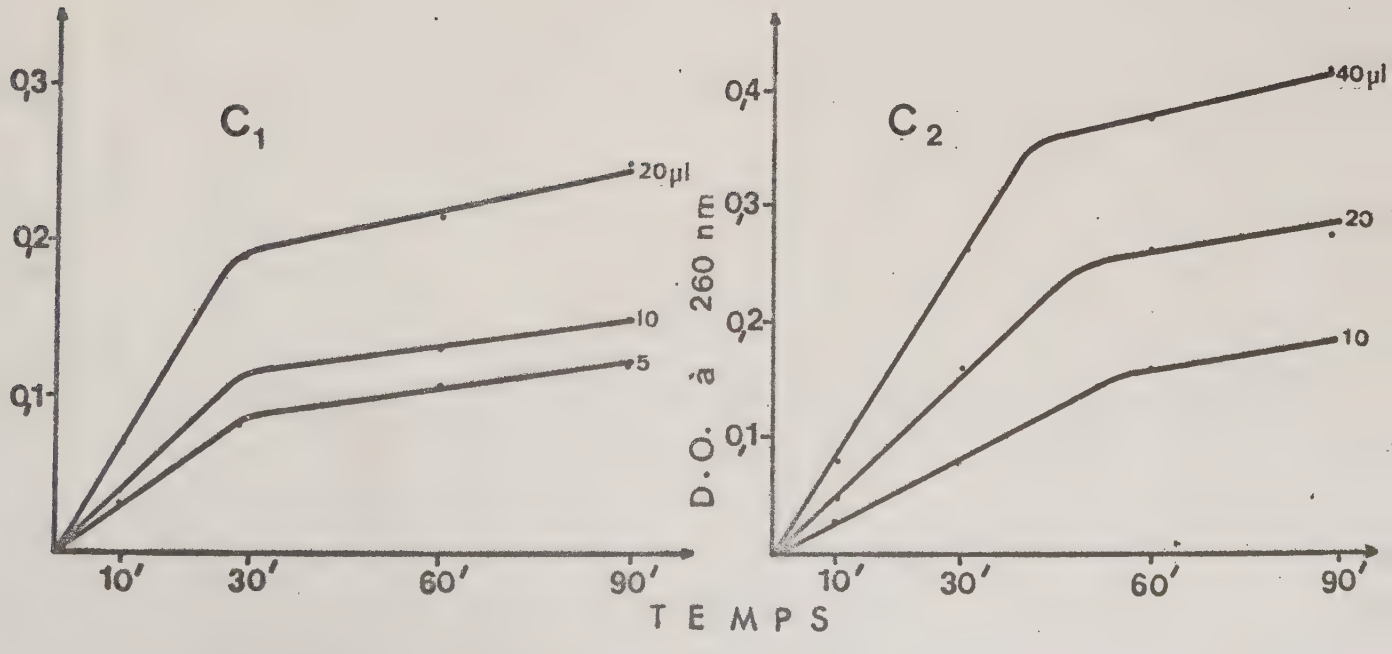
Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de l'activité maximale.

Figure 19: Evolution de l'activité des enzymes isolées en fonction du temps et de la concentration en enzyme.

Le milieu réactionnel, volume final = 1ml, contient 500µl de solution de RNA et des volumes variables d'enzyme complétés à 500µl avec le tampon adéquat.


A1
50 µl
30
25
20
10
1,0
0,5
10′
30′
60′
90′
A2
0,3
0,2
0,1
10 µ
5
2,5
D.O. à 260 nm
TEMPS


A3
20 µl
10
5
3,3
2,5
1,0
0,5
D.O. à 260 nm
10′
30′
60′
90′
TEMPS


C1
20µl
10
5
0,3
0,2
0,1
C2
40µl
20
10
0,4
0,3
0,2
0,1
D.O. à 260 nm
10′
30′
60′
90′
TEMPS

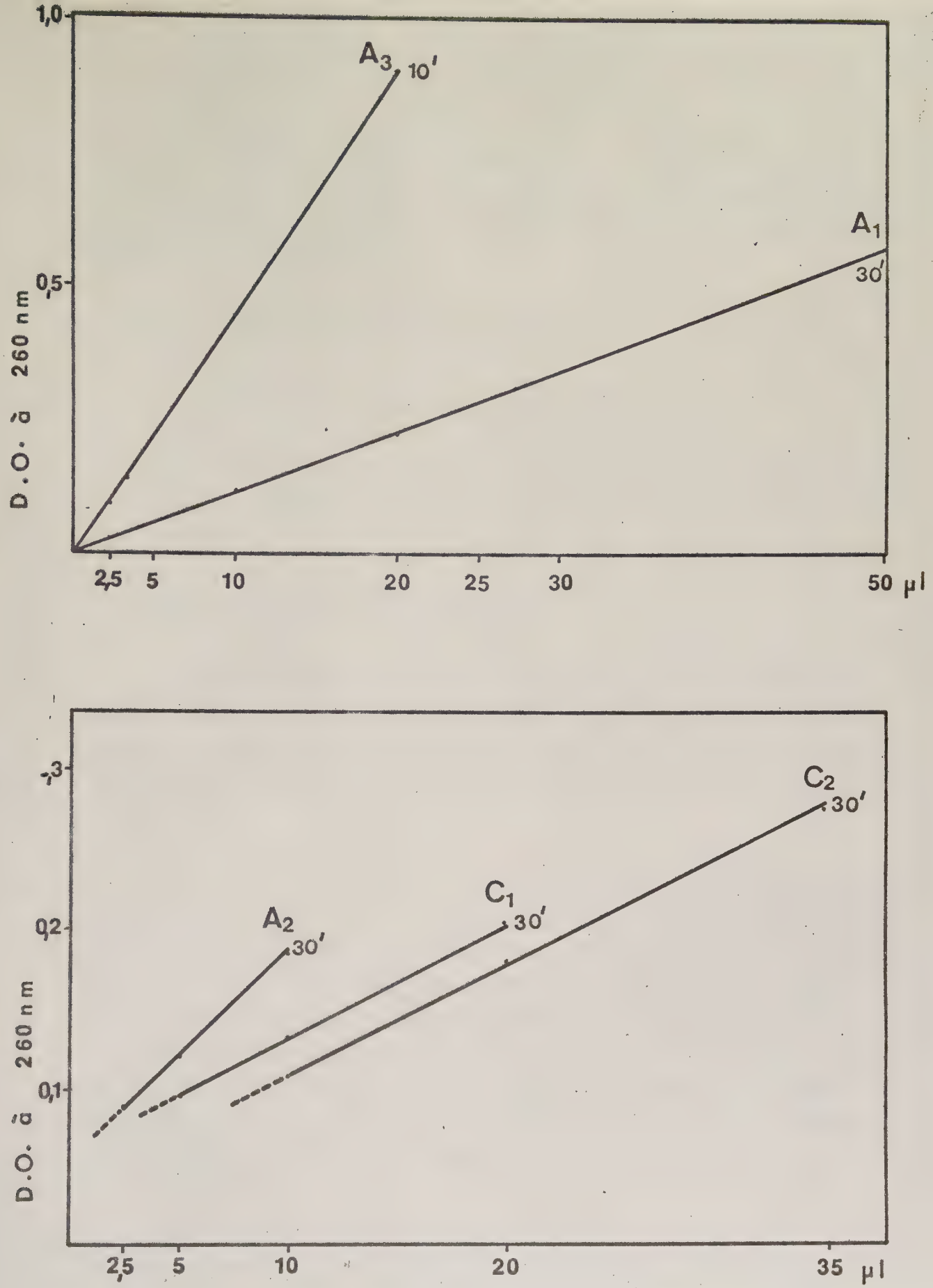


Figure 20: Variations de la vitesse initiale des enzymes isolées en fonction de la concentration en enzyme.

Pour faciliter la représentation graphique, on a porté en abscisse les volumes d'enzymes ajoutés dans le milieu réactionnel (volume final= 1ml).

l'origine. Ce comportement particulier ne peut être interprêté pour l'instant. Tout au plus, on peut envisager soit une précision insuffisante des mesures, étant donné l'activité relativement faible mise en jeu, soit des interactions par des protéines contaminantes.

3 - INFLUENCE DES CATIONS MONOVALENTS (Na^+, K^+)

L'influence de ces cations a été mesurée dans une gamme de concentrations de 50 à 250 mM. Le Na^+ n'a pratiquement aucun effet sur les activités enzymatiques. Par contre, le K^+ à une concentration de 200 mM, provoque une stimulation de l'activité des enzymes cationiques : de l'ordre de 30 % pour C_1 et 50 % pour C_2.

4 - INFLUENCE DES DIVERS CATIONS DIVALENTS

Cette étude a été réalisée en opérant une préincubation d'une durée d'une heure de chaque enzyme en présence des cations, sous forme de chlorure et utilisés à des concentrations de 10^{-2} à 10^{-4} M ; le test d'activité est effectué après dilution. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.

Il apparaît qu'aucun des cations utilisés ne provoque de stimulation importante ; tout au plus, pouvons-nous citer le Mg^{2+} qui produit une légère stimulation, de l'ordre de 30 %. Par contre, certains éléments métalliques ont une activité inhibitrice très nette, mais on constate cependant des différences de susceptibilité très marquées. Si toutes les protéines anioniques sont inhibées par le Hg^{2+}, seule la fraction A_3 l'est également par le Cu^{2+} (à 10^{-2}M) et le Zn^{2+} (à 10^{-3}M) ; les deux protéines cationiques ont leur activité enzymatique inhibée par le Hg^{2+}, Cu^{2+} et Zn^{2+} mais cependant nettement moins fortement que la protéine A_3.

Ion	[C]	Fraction				
2^+	M	A_1	A_2	A_3	C_1	C_2
Mg	10^{-2}	102	99	105	115	125
	10^{-3}	100	100	103	130	135
	10^{-4}	–	–	–	–	–
Ca	10^{-2}	100	100	105	98	95
	10^{-3}	100	100	108	100	98
	10^{-4}	–	–	–	–	–
Mn	10^{-2}	100	95	95	100	95
	10^{-3}	100	102	99	100	95
	10^{-4}	–	–	–	–	–
Cu	10^{-2}	85	75	0	0	30
	10^{-3}	100	98	0	5	45
	10^{-4}	–	–	10	40	–
Zn	10^{-2}	100	75	0	0	20
	10^{-3}	100	100	0	10	55
	10^{-4}	–	–	20	40	–
Hg	10^{-2}	0	0	0	0	10
	10^{-3}	10	0	0	0	60
	10^{-4}	–	–	30	30	–

Tableau VI: Influence de divers ions bivalents sur l'activité des enzymes isolées.

Chaque enzyme est incubée à 25°C, pendant une durée de 1h, en présence de divers cations sous forme de chlorure. Après dilution, l'activité enzymatique est mesurée dans les conditions habituelles. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de l'activité enzymatique non traitée.

Le Hg^{2+} est donc le seul cation, parmi ceux qui ont été utilisés, à inhiber les 5 enzymes isolées.

5 - STABILITE THERMIQUE

Pour la stabilité thermique le protocole expérimental suivant a été utilisé : les solutions d'enzymes sont portées pendant 10 mn à des températures comprises entre 35° et 90° C, puis, après refroidissement, utilisées pour la mesure d'activité. Les résultats obtenus (figure 21) montrent que tous les enzymes sont stables jusqu'à une température de 50 ° C. L'enzyme la moins thermostable est la fraction C_1, dont l'activité réduite de 50 % à 70° C, a totalement disparu à 90° C. L'enzyme A_2 occupe une place intermédiaire, puisque son activité n'a décru que d'environ 50 % à 70° C. Par contre, A_3 et C_2 semblent beaucoup plus résistantes à la température : elles conservent totalement leur activité à 70° C, mais celle-ci diminue très fortement à 90° C.

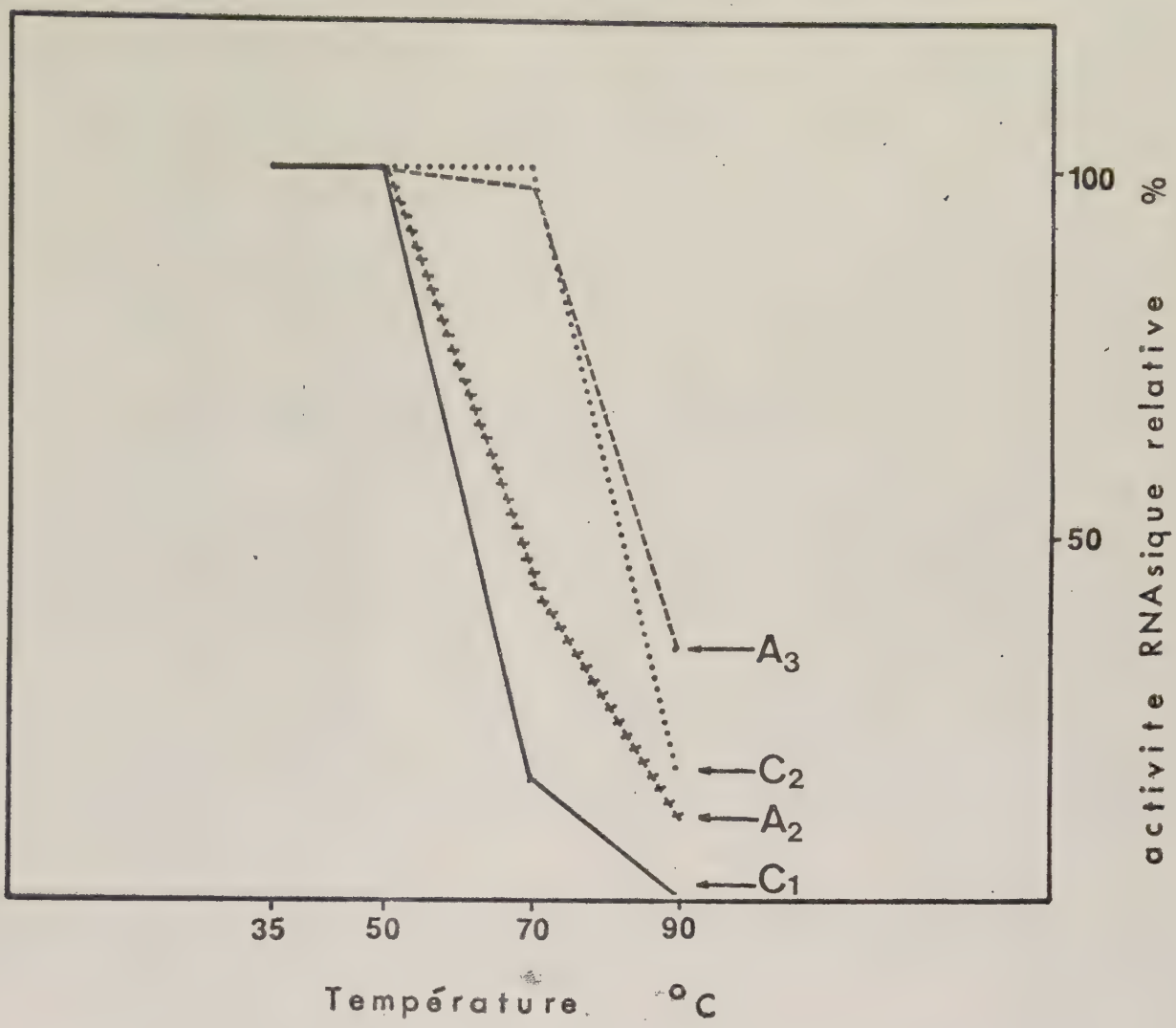


Figure 21: Action de la température sur l'activité des enzymes isolées.

Chaque enzyme est portée à la température indiquée, pendant une durée de 10mn, puis refroidie dans la glace pendant 5mn. La mesure d'activité RNAasique est effectuée dans les conditions habituelles. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de l'activité du témoin.

CHAPITRE 2

ETUDE DU MODE D'ACTION

Dans la première partie [chapitre 2, 2- c) et 3- b)], nous avons constaté que les cinq enzymes isolées sont dépourvues de toute activité phosphodiéstérasique et phosphomonoestérasique ; il est donc vraisemblable qu'elles appartiennent à la classe générale des "Nucléases". Cependant, avant d'aborder l'étude de leur mode d'action, il nous a semblé nécessaire de déterminer si toutes ces enzymes présentaient ou non une spécificité vis-à-vis du sucre. Nous envisagerons donc successivement l'étude de la spécificité vis-à-vis du sucre, puis des bases, en utilisant des homopolymères, et enfin, nous terminerons par la mesure, basée sur l'utilisation d'homopolymères radioactifs, des capacités d'attaque des structures secondaires et du caractère endo ou exonucléolytique de leur action.

1 - SPECIFICITE VIS-A-VIS DU SUCRE

Pour déterminer cette spécificité, nous avons mesuré la capacité d'attaque de DNA de thymus de veau, soit hautement polymérisé, soit dénaturé par un traitement thermique, en opérant à pH 7,0 en présence de Mg^{2+} (mesure de l'activité DNAsique "alkaline"), soit à pH 5,0 en présence d'EDTA (mesure de l'activité DNAsique "acide").

Les résultats obtenus ont montré qu'une seule des fractions isolées est capable d'hydrolyser le DNA, la fraction A_1. L'activité DNAsique mesurée est équivalente à $5.\ 10^{-3}$ µg/ml de DNAse pancréatique.

Il apparaît donc que l'enzyme A_1 doit être considérée comme une nucléase et les autres enzymes comme des ribonucléases.

2 - SPECIFICITE VIS-A-VIS DES BASES

Les homopolymères utilisés pour cette étude ont été les poly (A), poly (I), poly (C) et poly (U). Deux remarques à ce sujet nous semblent devoir être faites. La première est le pH auquel le test est effectué qui est de 7,0. Cette valeur a été retenue bien que ne correspondant pas aux maxima préalablement déterminés, pour éviter l'écueil de la formation de structure secondaire qui peut se produire notamment avec le poly (A) à des pH plus acides.
La seconde concerne l'ultilisation de poly (I) à la place du poly (G). En effet, ce dernier polymère présente, en solution à pH 7,0, une forte struture secondaire (28) qui empêcherait d'obtenir des résultats significatifs.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VII. De leur analyse, il ressort le caractère général suivant ; si les enzymes anioniques sont actives sur les polymères puriques et à un degré moindre sur les pyrimidiques, les RNAses cationiques n'attaquant que les polymères pyrimidiques.

En ce qui concerne les enzymes envisagées individuellement, nous constatons que :

- la nucléase (A_1) attaque avec à peu près la même efficacité les quatre polymères ;

- la RNAse A_2 est inactive vis-à-vis du poly (C) ;

- la RNase A_3 attaque tous les polymères, mais beaucoup plus difficilement cependant le poly (C) ;

- les RNAses C_1 et C_2 ont un comportement analogue, étant aussi actives vis-àvis du poly (U) que du poly (C).

Fraction	Homo-polymère	T E M P S						
		20′	30′	40′	60′	90′	120′	240′
A_1	poly A	3	–	10	30	43	–	–
	poly I	–	–	25	45	–	–	–
	poly U	3	–	11	42	50	–	–
	poly C	11	–	23	36	47	–	–
A_2	poly A	3	15	–	45	65	–	–
	poly I	–	–	40	80	–	–	–
	poly U	8	19	–	45	87	–	–
	poly C	–	–	–	3	7	17	36
A_3	poly A	100	100	100	100	–	–	–
	poly I	100	–	–	100	–	–	–
	poly U	45	47	59	75	–	–	–
	poly C	6	–	15	20	35	–	–
C_1	poly A	–	–	–	2	-	2	8
	poly I	–	–	–	1	23	–	–
	poly U	17	25	–	37	43	–	–
	poly C	–	25	–	28	40	–	–
C_2	poly A	–	–	–	1	–	2	15
	poly I	–	–	–	5	28	–	–
	poly U	11	27	–	37	56	–	–
	poly C	–	27	–	33	51	–	–

Tableau VII: Mesure de la spécificité des enzymes isolées vis-à-vis des bases.

Le degré d'hydrolyse des homopolymères est évalué, en fonction du temps, par la mesure à 260nm de la quantité des produits acido-solubles formés. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'hydrolyse du polymère initialement présent.

3 - DETERMINATION DE LA CAPACITE D'ATTAQUE DES STRUCTURES SECONDAIRES

Pour aborder l'étude de cette caractéristique d'une façon relativement simple et efficace, il était nécessaire de disposer d'homopolymères radioactifs. Ceux-ci ayant été synthétisés au laboratoire,* nous envisagerons donc successivement les conditions de leur synthèse et purification puis de leur utilisation.

a) Conditions de synthèse et de purification des poly (A), poly (U), et poly (C)

La synthèse de ces polymères est réalisée en utilisant la polynucléotide pyrophosphorylase et les nucléosides diphosphates correspondants. Les courbes de la figure 22 montrent que la polymérisation, mesurée par la radioactivité précipitable par l'acide, est terminée au bout de 60 mn et les données du tableau VIII indiquent les quantités de polymères obtenus. La purification de ces polymères a été effectuée par filtration sur Séphadex G-75. Les courbes obtenues, figure 23, montrent que les polymères sont bien séparés du reliquat de nucléoside de P, mais aussi qu'ils sont constitués par un mélange de deux populations de taille légèrement différentes. Dans le cas des poly (A) et poly (U), les molécules les plus lourdes ont été reprises et rechromatographiées sur Séphadex G-75 de façon à obtenir une population homogène (figure 24).

b) Réalisation des duplex poly (A).poly (U) et poly (I). poly (C)

Deux complexes poly A. poly (U) ont été formés, l'un utilisant le poly (A) marqué au C^{14}, l'autre le poly (U) au ^{3}H. Le duplex poly (I). poly (C) a été formé en employant le poly (C) marqué au tritium.

---

* en collaboration avec M. N. N THANG, Institut de Biologie Physico-Chimique, PARIS.

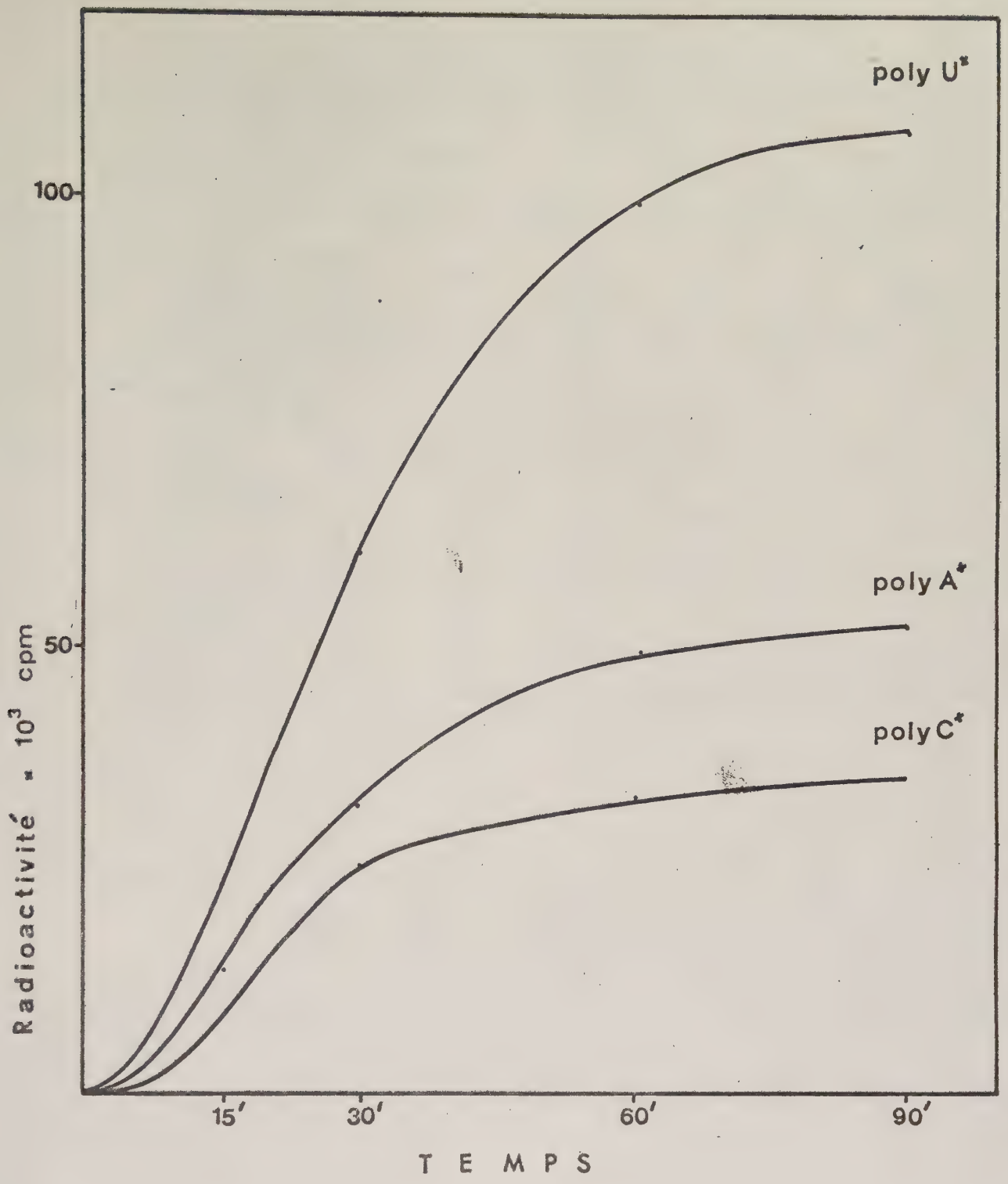


Figure 22: Evolution, en fonction du temps, de la formation d'homopolymères radioactifs.

La polymérisation des nucléosides diphosphates (ADP-^{14}C, CDP-^{3}H, UDP-^{3}H) est effectuée en utilisant la polynucléotide pyrophosphorylase (volume réactionnel = 1ml) et elle est suivie en mesurant, sur des aliquotes de 2µl, la radioactivité précipitable par l'acide.

	A D P	U D P	C D P
Quantité initiale µmole	10	10	10
Radioactivité initiale cpm	$184 .10^6$	$7,6 .10^7$	$7,2.10^7$
Polymèrisation cpm	$9,1 . 10^6$	$22,58.10^6$	$5,7.10^6$
Quantité obtenue µmole	5	3	8

Tableau VIII: Quantité d'homoplomères radioactifs obtenus à partir des nucléosides diphosphates correspondants Elle est déterminée par le rapport de la radioactivité précipitable par l'acide à la radioactivité initiale et elle est exprimée en équivalents (µmoles) du nucléoside correspondant.

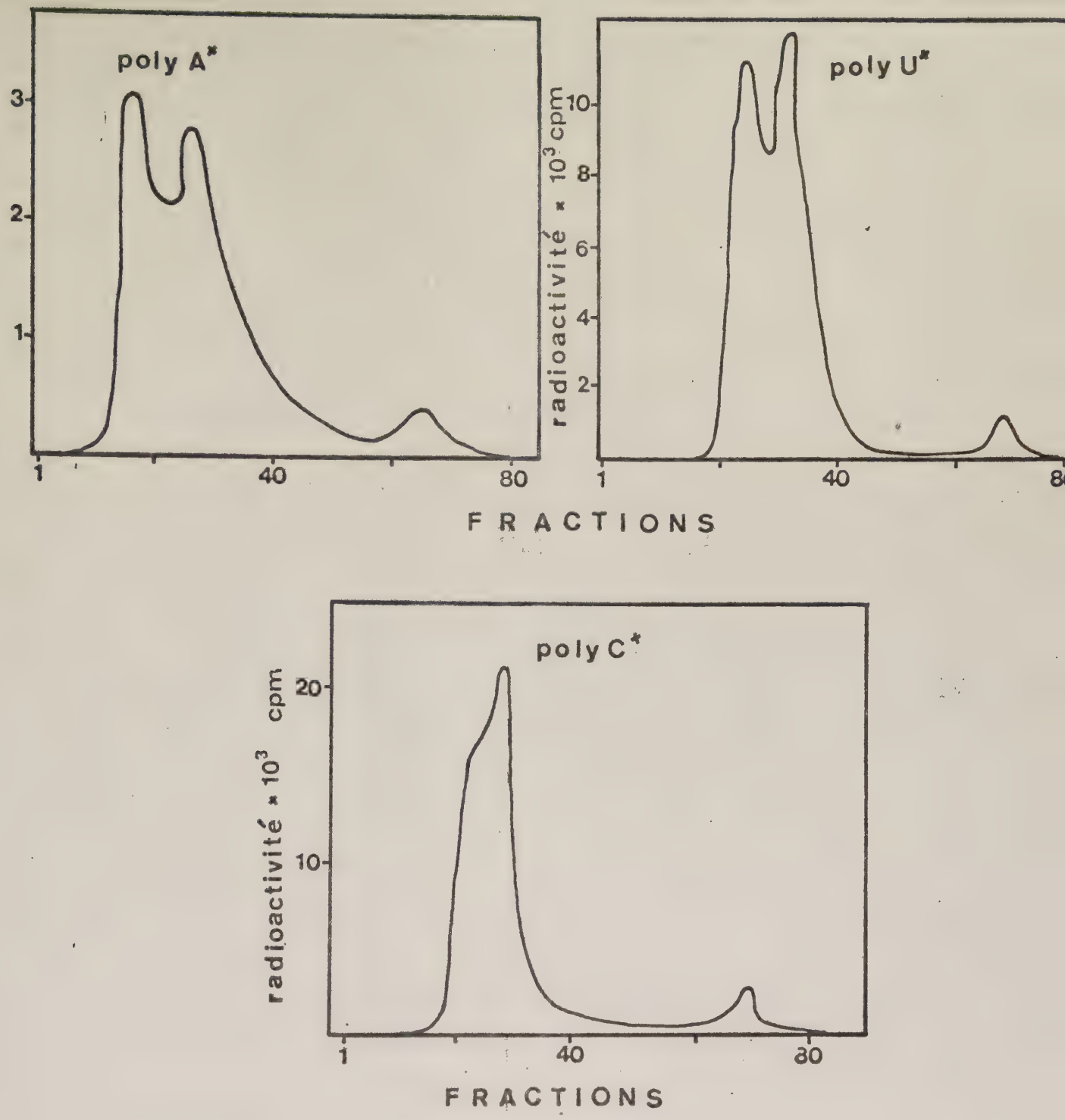


Figure 23: Chromatographie sur Sephadex G-75 des homoplymères synthétisés.

Après précipitation par l'alcool du mélange réactionnel de polymérisation, le culot est dissous dans 400ul de Tris 50mM pH 7,5, KCl 0,1M. La totalité de cette solution est déposée sur une colonne de 1x27cm; débit: 3,1ml/cm^2/h; volume des fractions: 400µl; mesure de la radioactivité sur des aliquotes de 20µl.

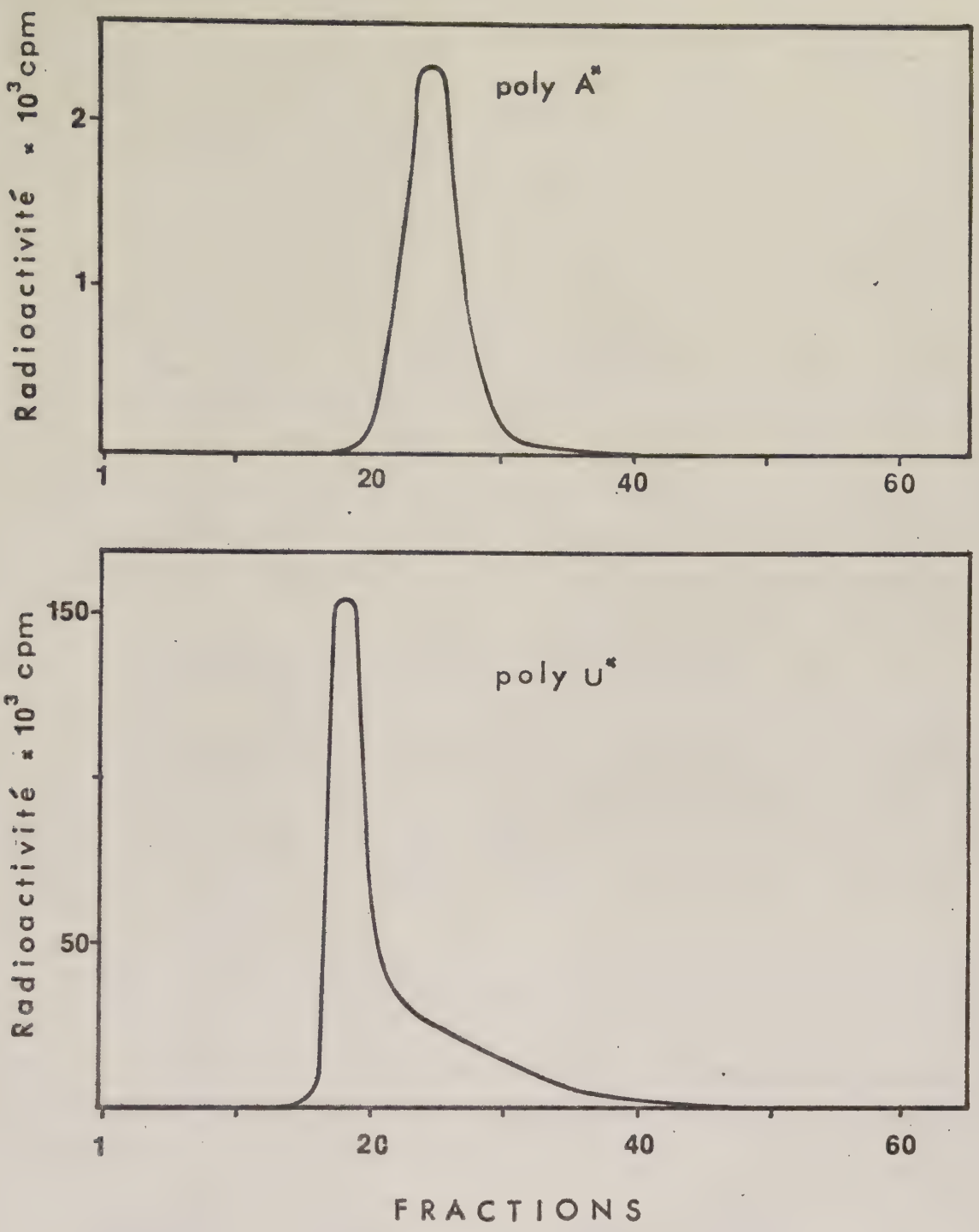


Figure 24: Purification des homopolymères poly(A) et poly(U). Les fractions les plus lourdes, obtenues lors de la chromatographie sur Sephadex G-75 (figure 23) ont été mélangées puis précipitées par l'alcool. Après dissolution du culot dans 200µl de Tris 50mM pH 7,5, KCl 0,1M, la totalité de la solution a été déposée sur une colonne de Sephadex G-75 équilibrée avec le même tampon. Les conditions de la chromatographie sont identiques à celles décrites à la figure précédente.

b. 1. Formation des complexes poly (A). poly (U)

La formation de ces complexes a été suivie en utilisant la méthode des variations continues (26) ; elle est basée sur la mesure de la densité optique à 260, 279,7 et 283,5 nm. Les courbes obtenues sont présentées dans la figure 25. Le complexe poly (A).poly(U) qui devrait se former pour des quantités équimoléculaires de poly (A) et poly (U) n'apparaît pas sur la figure 25 a, le point d'intersection de cette courbe correspondant au complexe poly (A). 2 poly (U). Par contre, il ressort de la figure 25 b et c que le complexe poly (A). poly (U) est bien formé pour un mélange équimoléculaire de deux polymères.

b. 2. Formation du complexe poly (I). poly (C)

Dans le cas du complexe poly (I). poly (C), aucune structure à triple brin n'étant détectable (29), les mesures de variation de densité optique peuvent être effectuées à 260 nm. Elles sont présentées dans la figure 26. Elles montrent que le complexe poly (I). poly (C) a bien été obtenu pour un mélange équimoléculaire.

c) Mesure de la capacité d'attaque des structures secondaires

Les valeurs du tableau IX montrent qu'aucune des enzymes isolées n'attaquent dans les conditions expérimentales utilisées, les complexes à double brin.

4 - DETERMINATION DU CARACTERE ENDO OU EXONUCLEOLYTIQUE

Pour déterminer si les RNAses isolées sont des endo ou exonucléases, nous avons utilisé le protocole expérimental décrit par KASAI et GRUNDBERG-MANAGO (17). Il est basé sur la séparation par chromatographie sur papier des produits d'hydrolyse en utilisant un solvant à base n-propanol et durée de chromatographie de 24 à 48 heures. Dans ces conditions, les pro-

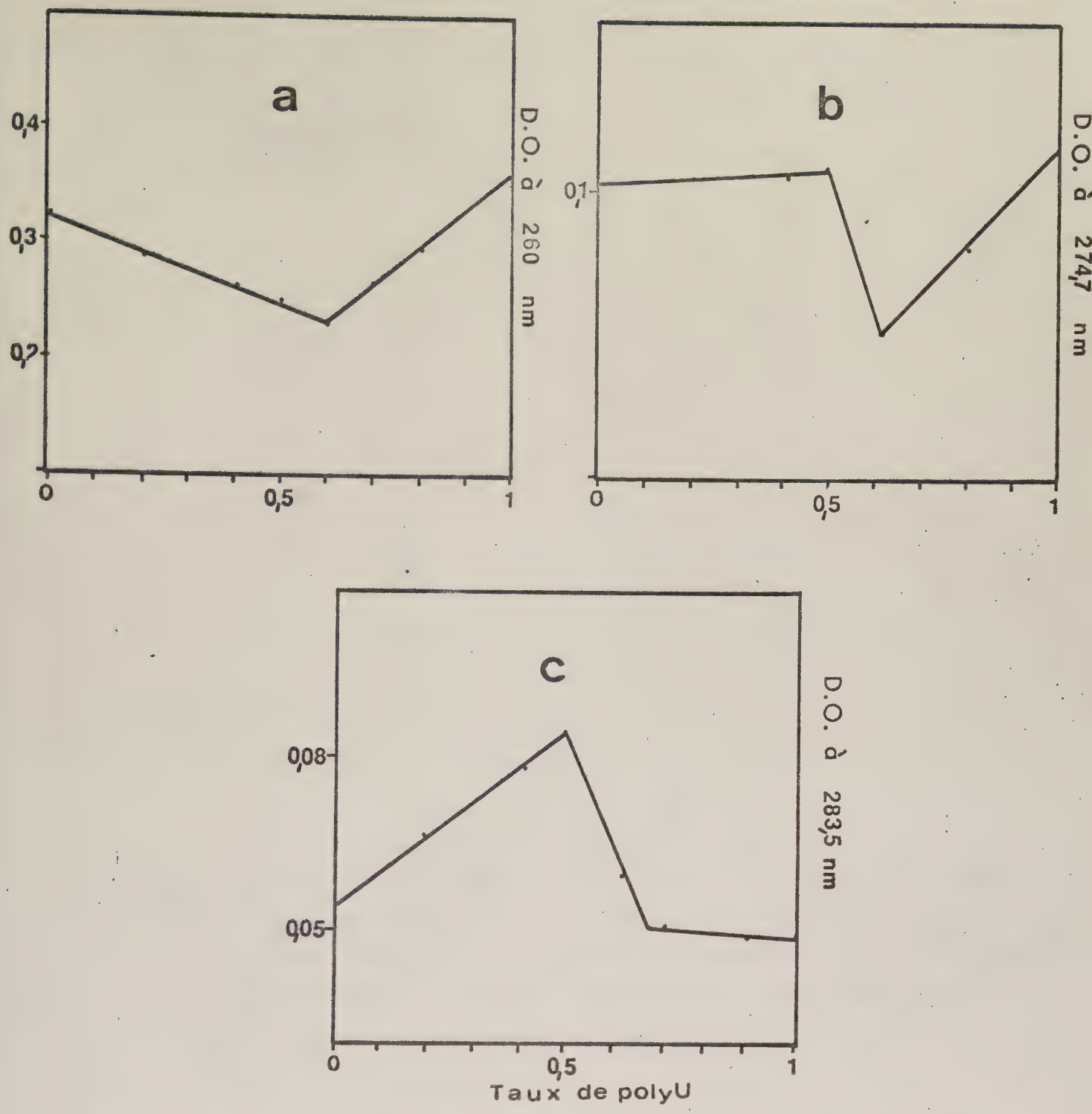


Figure 25: Etude de la formation des complexes poly(A).poly(U) par application de la méthode de variations continues. La formation des complexes, dans du tampon Tris 50mM pH 7,5, KCl 0,1M, est suivie par la variation de densité optique à 260 (a), 274,7 (b) et 283,5nm (c). Les courbes sont obtenues en portant la densité optique des mélanges des deux polymères en fonction du taux en poly(U), la concentration totale en nucléotides étant constante.

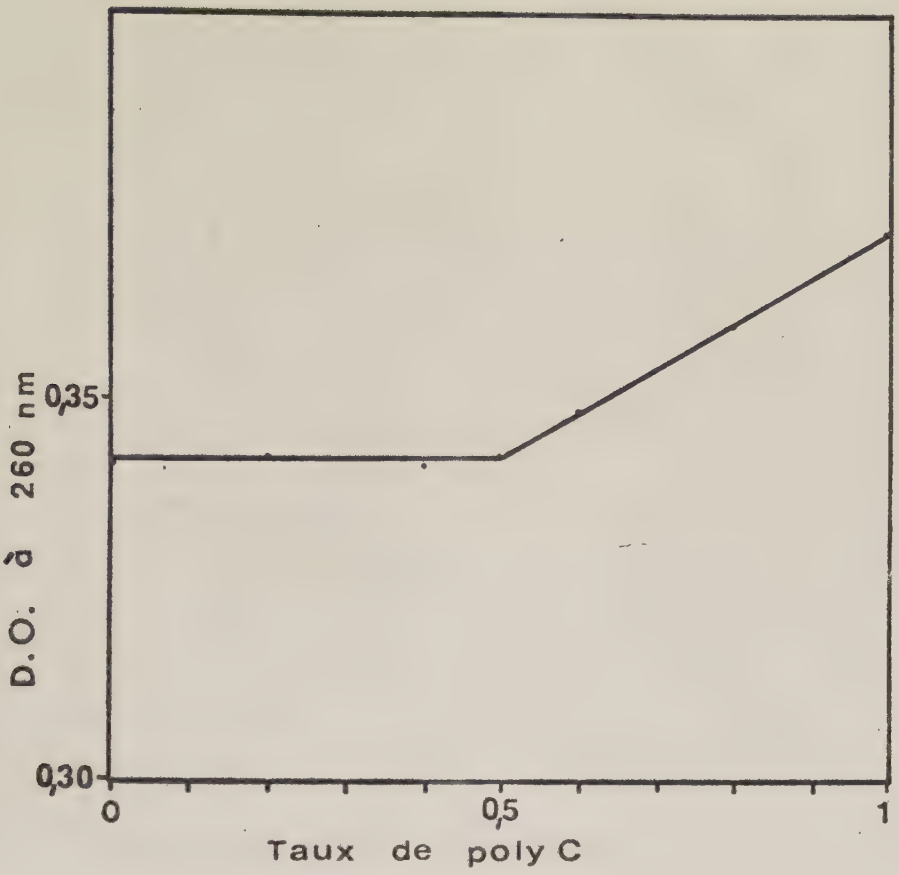


Figure 26: Etude de la formation du complexe poly(I).poly(C) par application de la méthode de variations continues. Les conditions sont identiques à celles de la figure 25, mais les mesures de densité optique ne sont effectuées qu'à 260nm.

	RADIOACTIVITE cpm					
Complexe	polyA . polyU*		polyA* . polyU		polyI . polyC*	
Temps	1^h	3^h	1^h	3^h	1^h	3^h
Témoin	1463	1483	3618	3362	2366	5776
A_1	1349	1592	3694	3167	—	—
A_2	1462	1491	3617	3427	2823	5675
A_3	1388	1562	3369	3432	2522	5898
C_1	1136	1489	3225	3373	2589	6112
C_2	1476	1385	3538	3218	2451	5263

Tableau IX: Détermination de la capacité d'attaque des structures secondaires.

Elle est basée sur la mesure de la radioactivité, précipitable par l'acide, de duplex dont un seul composant, noté par un astérisque, est radioactif. Les durées d'incubation, en absence ou en présence des enzymes isolées, ont été de 1 et 3h.

duits sont séparés d'après la longueur de leurs chaînes.

Les expériences ont porté sur le poly (A) pour les RNAses anioniques et le poly (U) pour les cationiques, les durées d'hydrolyse étant, dans tous les cas, relativement courtes : de 10 à 30 mn suivant les enzymes.

Un exemple type des résultats obtenus est présenté dans la figure 27. Cet histogramme, relatif à l'hydrolyse du poly (A) par l'enzyme A_3, montre clairement l'absence d'AMP. La séparation des produits de l'hydrolyse n'est cependant pas suffisamment nette pour pouvoir en tirer des conclusions quant à leur longueur.

Il est permis de conclure que les quatre ribonucléases isolées sont du type endonucléolytique.

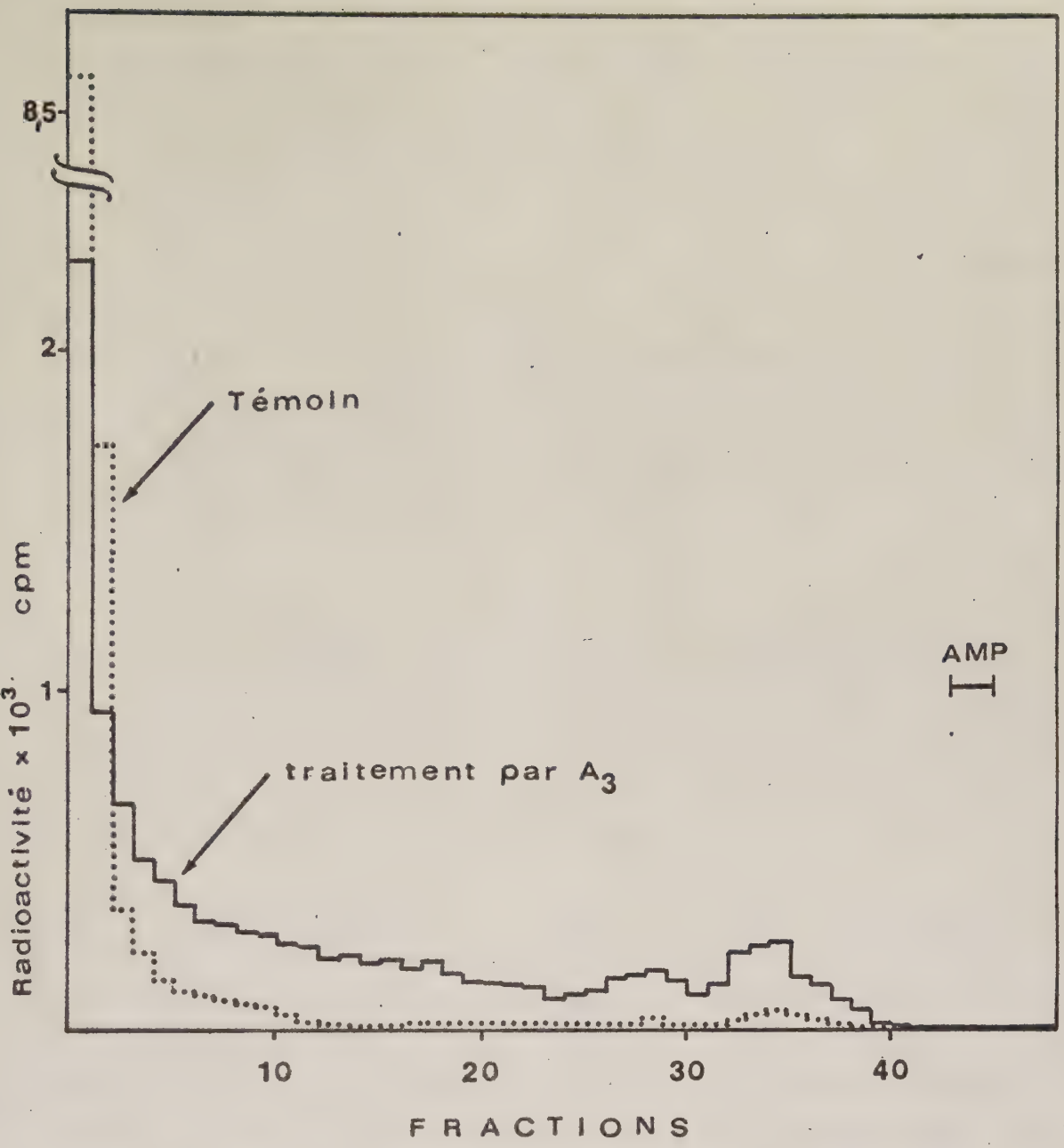


Figure 27: Analyse, par chromatographie sur papier, des produits de l'hydrolyse enzymatique du poly(A).

Le mélange d'incubation, pour l'hydrolyse du poly(A), est constitué de 20µl de la fraction A_3 et 80µl de poly(A) dissous dans du Tris 50mM pH 7,5, KCl 0,1M. Après 10mn à 25°C, 20µl du mélange sont prélevés et déposés sur du Whatmann 3MM. Solvant de chromatographie: n-propanol/NH_3/eau (55:10:35). Le témoin est constitué par du poly(A) mis à incuber dans les mêmes conditions mais en absence d'enzyme.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les ribonucléases végétales ont été étudiées depuis de nombreuses années et à partir de matériels divers, mais la plupart des études ont porté sur l'évolution des teneurs en ribonucléases d'organes ou fragments d'organes placés dans des conditions physiologiques diverses, les auteurs utilisant des préparations enzymatiques brutes (6,49). Un nombre relativement de publications a trait à la purification des diverses nucléases végétales.

Les RNAses qui ont été purifiées sont très souvent des enzymes extraites de feuilles de Tabac (1, 9, 12, 32, 33, 54), des Graminées, Avoine (50, 42, 52, 53, 55) ou Blé (10,38). Il est à remarquer que chaque auteur utilise des conditions qui lui sont propres, tant pour l'extraction que pour la purification, et celles-ci sont tellement variées qu'il est impossible d'en déduire une ligne directrice.

C'est ainsi que certains auteurs (14, 12, 32, 52, 27, 31, 31, 41) acidifient le broyat initial jusqu'à un pH voisin de 4,5, ce qui provoque la formation d'un précipité. A l'exception de HOLDEN et PIRIE (12) qui ont observé une perte de 10 à 15 %, aucun des auteurs ne mentionne si une telle vérification a été effectuée. D'autre part, WALTERS et LORING (43) ont mis en évidence, dans le cas des tigelles de Phaseolus aureus qu'une acidification de l'extrait initial entraîne une nette diminution de l'activité d'une fraction, individualisée par chromatographie sur DEAE-cellulose et comprenant une RNAse et une nucléotidase. Il ne semble donc pas qu'une acidification de l'extrait initial puisse avoir une portée générale et présente un intérêt réel. Ceci est confirmé par les résultats que nous avons obtenus, dans le cas des racines de Fève, où nous n'avons pas constaté de formation de précipité ni diminution notable des activités des phosphomono et phosphodiestérases [(chapitre 1,1c) -première partie].

La précipitation par le sulfate d'ammonium ne semble pas etre une constante dans l'isolement des RNAses végétales. On constate, de plus, parmi les auteurs qui l'appliquent, une assez grande variabilité dans les pourcentages de saturation retenus. Certains (14, 54, 37) précipitent les protéines en utilisant une concentration de sulfate d'ammonium correspondant à un pourcentage de saturation de 80 %, d'autres (9,12, 10, 27, 31, 53) opèrent en deux étapes. Après une première précipitation avec un pourcentage de saturation variant, suivant les auteurs, de 25 à 57 %, le surnageant obtenu est porté à un pourcentage de 70 à 85 %. Les études que nous avons faites nous ont conduits à retenir une démarche analogue, mais nous avons constaté [(chapitre 1, 2, a) -première partie-] que la précipitation maximale des RNAses a lieu entre 60 et 85 %. Les données de MEROLA et DAVIS (27) dans le cas de racines de Soja, confirment ce comportement. En effet, ces auteurs, au cours d'une étude de précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium, ont constaté que le maximum d'activité RNAsique est présente dans le précipité obtenu entre 60 et 70 %. La précipitation pratiquement totale des P.M.E. et P.D.E. entre 40 et 60 % aurait pu nous conduire à retenir, pour purifier les RNAses, la zone 60-85%. Cependant, la précipitation des RNAsès est nettement perceptible dès que le pourcentage de saturation atteint 40 %, et cela nous a donc amenés, pour obtenir une récupération quantitative à retenir la zone 30-55 %.

Les protéines extraites sont, soit directement utilisées, soit préalablement dialysées, la dialyse étant effectuée contre l'eau distillée (35, 9, 12, 42, 27, 41, 37) ou du tampon (31,43). La dialyse contre l'eau distillée entraîne toujours la formation d'un précipité mais seuls HOLDEN et PIRIE (12), FRISCH-NIGGEMEYER et REDDI (9) signalent qu'il se produit une perte d'activité RNAsique dont une partie peut être récupérée par dissolution partielle du précipité dans du tampon. Nos résultats ont clairement montré que la dialyse contre l'eau distillée [(chapitre 1, 2, b) -première partie]entraîne une perte trop importante (près des 2/3 de l'activité ribonucléasique) pour contrebalancer la purification partielle obtenue.

Les techniques de purification utilisées sont également fort variables et aboutissent à des degrés de purification plus ou moins élevés. Parmi ces techniques, citons la précipitation éthanolique (10), l'adsorption sur alumine (9,37), l'échange d'ions sur résines (41,30) ou cellulose subtituées (10, 38, 41, 43, 44, 47), la filtration sur gel (50, 42, 52, 53, 47).D'autres auteurs (14,45) combinent dans un ordre variable, plusieurs de ces techniques et obtiennent des RNAses purifiées.

Cette diversité rend très difficile la comparaison des diverses enzymes séparées, cependant le classement proposé par WILSON (49) permet de tenter de comparer les enzymes que nous avons isolé à celles déjà connues.

Il semblerait que la fraction A_1 par certaines de ses propriétés (action sur DNA et RNA, pH optimum voisin de 6,0, caractère endonucléolytique, pas de spécificité tranchée vis-à-vis des bases) puisse correspondre à l'enzyme appelée Nuclease I par WILSON (49). Cependant, nous n'avons pas observé comme certains auteurs (38,23) la nécessité d'un cation divalent pour obtenir une activité maximale.

Les RNAses A_2 et A_3, tant par leur faible poids moléculaire, leur caractère endonucléolytique et leur relative préférence pour les purines, sont assez voisines du groupe des RNAses I et II de WILSON (49). Un élément de désaccord réside dans les valeurs du pH optimum, qui seraient de 5,0 à 6,0 pour la RNAse I et de 6,0 à 7,0 pour la RNAse II, alors que nous avons trouvé un pH optimum de 6,2 pour A_2 et de 6,4 pour A_3. Ces différences pourraient être dûes à la nature du substrat, du tampon, et de la force ionique utilisés pour les mesures d'activité. Il semblerait cependant, d'après les critères de spécificité et du fait que la fraction A_3 représente l'enzyme la plus abondante de notre matériel, que l'on puisse envisager une correspondance, d'une part entre la fraction A_3 et la RNAse I, et d'autre part entre l'enzyme A_2 et la RNAse II.

Les RNAses cationiques que nous avons isolées se distinguent nettement des enzymes précédentes par leur point isoionique qui est beaucoup plus élévé et leur préférence très nette pour les pyrimidines. Il est curieux que ces enzymes n'aient jamais été -mis à part une publication faisant état de l'exsitence dans les plantules de Concombre (16) d'une RNAse libérant préférentiellement de l'acide uridylique- signalées dans la littérature. Deux éléments peuvant rendre compte de cette situation. Le premier réside dans le fait que la plupart des auteurs ne sont intéressés à la fois qu'à une ou deux enzymes. Le second concerne les quantités de ces enzymes qui dans notre matériel ne semblent être (tableau IV) que des composants mineurs.

Lors de la chromatcgraphie des protéines cationiques sur CM-cellulose nous avons observé (fraction X, figure 14) l'existence de protéines qui se sont avérées être du type anionique (figure 17). Ce comportement pourrait être interprêté comme l'indice d'une simple contamination, dûe à un lavage insuffisant de la colonne, lors de la séparation initiale en protéines anioniques et cationiques. Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer la présence répétée de ces protéines lors de la chromatographie des fractions C_α et C_β (figures 15 et 16). Des déterminations, par électrofocalisation, des points isoioniques des protéines notées X ont montré qu'elles étaient intermédiaires entre les protéines anioniques et cationiques. Il nous semble donc que l'on pourrait envisager des phénomènes d'attraction entre les protéines cationiques et certaines protéines à caractère anionique relativement faible. D'autre part, ces protéines X présentent une ou plusieurs activités ribonucléolytiques, qu'il n'a pas été possible d'individualiser très nettement. Dans le but de déterminer si ces activités pourraient être le reliquat des RNAses anioniques, nous avons réalisé l'étude de certaines de leurs propriétés. Leur pH optimum (pH 7,6), une légère stimulation par le Mg^{2+} et le Zn^{2+}, la préférence pour les pyrimidines, indiquent qu'elles se rapprocheraient partiellement les RNAses cationiques. Cette activité de nature ribonucléolytique, présente dans la fraction X, et pouvant éventuellement correspondre à plusieurs enzymes, pose donc un problème intriguant qu'il ne nous a pas été possible de résoudre.

En tout état de cause, on peut considérer leur mise en évidence comme un indice de l'existence de ribonucléases distinctes de celles que nous avons isolées et étudiées en détail. Cette conclusion est somme toute logique si l'on songe aux diverses enzymes susceptibles d'intervenir dans le métabolisme des RNA (21), par exemple, enzymes opérant dans les processus de maturation (tRNA, rRNA, mRNA), la dégradation spécifique des mRNA.

&
&&&&&&&&&&&&

La démarche expérimentale que nous avons adoptée et qui est basée sur la séparation des protéines extraites en fractions à comportement anionique et cationique, nous a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs activités nucléolytiques, sans parler des phosphomonoestérases et phosphodiéstérases (dont une 5' exonucléase) qui n'ont pas retenu notre attention.

Les activités ribonuclolytiques que nous avons isolées sont dépourvues de contamination par des phosphomono et phosphodiestérases. Ce résultat généralement peu courant dans le cas des RNAses végétales a pu être obtenu par la filtration sur gel qui permet de séparer les phosphoestérases dont le P. M. est supérieur à 40.000.

Des cinq activités mises en évidence, la nucléase A_1 et la ribonucléase A_3 sont les enzymes quantitativement majeures et elles ont été obtenues avec un bon degré de pureté. Les ribonucléases A_2 et C_1, C_2 sont des enzymes présentes en quantités beaucoup plus faibles. Il semblerait que l'isolement des ribonucléases C_1 et C_2, à comportement cationique, n'a jamais été encore signalé. Leur mise en évidence nous semble être dûe au

fractionnement en protéines à comportement anioniques et cationiques et l'étude sytématique de ces deux fractions, caractéristiques marquantes de notre démarche expérimentale.

L'étude du mode d'action des enzymes isolées a été basée sur l'utilisation d'homopolymères froids ou radioactifs, les derniers étant synthétisés au laboratoire. Ceci nous apermis de réaliser, pour la première fois, dans le cas des ribonucléases végétales, l'analyse de la capacité d'attaque des substrats présentant une structure secondaire. Il apparaît que les quatre ribonucléases isolées permettent un mode d'hydrolyse endonucléolytique mais qu'aucune d'elles n'est susceptible d'attaquer les duplex tels que les poly (A). poly (U) ou poly (I). poly (C).

L'étude des propriétés et du mode d'action de ces activités, résumées dans le tableau X, permet d'aboutir à la conclusion qu'elles correspondent vraisemblablement à des espèces moléculaires distinctes.

L'existence dans notre matériel d'au moins quatre ribonucléases pose donc le problème de leur fonction métabolique précise. Il nous semblerait nécessaire, pour le résoudre, d'orienter l'expérimentation dans deux directions complémentaires : l'analyse de leur localisation cellulaire et la recherche du ou des types de RNA présent(s) dans les cellules de racine de Fève et pour le(s) le(s)quel(s) elles pourraient présenter une spécificité marquée.

PROPRIETES		A_1	A_2	A_3	C_1	C_2
		Nucléase I	RNAse II	RNAse I	—	—
pH optimum		5,8	6,2	6,4	6,2	7,2
stabilité θ à	70^0	−	−	+	−	+
	90^0	−	−	−	−	−
stimulation par K^+		−	−	−	+	+
inhibition par	Cu^{++}	+	+	+++	++	++
	Zn^{++}	−	+	+++	++	++
	Hg^{++}	+++	+++	+++	++	++
spécifité envers le sucre		−	+	+	+	+
capacité d'attaque des homopolymères	polyA	+	+	+	−	−
	polyI	+	+	+	−	−
	polyU	+	+	+	+	+
	polyC	+	−	∓	+	+
capacité d'attaque des doubles brins		−	−	−	−	−
caractère	endo-nucléase	+	+	+	+	+
	exo-nucléase	−	−	−	−	−

Tableau X: Tableau récapitulatif de quelques propriétés des enzymes isolées.

B I B L I O G R A P H I E

01 BAGI, G., FARKAS, G. L. (1967), Phytochem., 6, 161.

02 BAILEY, J. J. (1962), Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, 192.

03 BARNARD, E. A. (1969), Ann. Rev. Biochem., 38, 677.

04 BERNARDI, A., BERNARDI, G., (1966), Bioch. Biophys. Acta, 129, 23.

05 BURI, J. F., Communication personnelle .

06 DOVE, L. D., (1973), Phytochem, 12, 2561.

07 de DUVE, C., (1971), J. Cell. Biol., 50, 20 D.

08 DYER, T. A., PAYNE, P. I., (1974), Planta, 117, 259.

09 FRISCH, W., NIGGEMEYER, W., [illegible]DI, K. K., (1957), Bioch. Biopys. Acta, 26, 40.

10 HANSON, D. M., FAIRLEY, J. L., (1969), J. Biol. Chem., 244, 2440.

11 HIRAI, M., ASAHI, T., (1973), Plant Cell Physiol., 14, 1019.

12 HOLDEN, M., PIRIE, N. W., (1963), Biochem. J., 60, 39.

13 HSIAO, T. C., (1968), Plant Physiol., 43, 1355.

14 JERVIS, L., (1974), Phytochem., 13, 709.

15 JERVIS, L., PIRIE, N. W., (1974), Phytochem., 13, 715.

16 KADO, C. I., (1968) Arch. Biochem. Biophy., 125, 86.

17 KASAI, K., GRUNBERG-MANAGO, M., (1967), European J. Biochem., 1, 152.

18 LANTERO, O. J., KLOSTERMAN, H. J., (1973), Phytochem., 12, 775.

19 LASKOWSKI, M. Sr., (1966), in Procedures in Nucleic Acid Research (CANTONI, GL. DAVIES, R. R., eds), p. 85, Harper & Row, New-York.

20 LASKOWSKI, M. Sr. (1967), Advan. Enzymol., 29, 165.

21 LEVY, C. C., (1975), Life Sciences, 17, 311.

22 LITWACK, G., (1963), John Wiley & sons, New-York.

23 LORING, H. S., Mc. LENNAN, J. E., WALTERS, T. L., (1966), I. Biol. Chem., 241, 2

24 LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. I, RANDALL, R. J., (1951), I. Biol. Chem., 193, 265

25 MACARTHY, M., (1945/46), J. Gen. Physiol., 29, 123.

26 MASSOULIE, J., BLAKE, R., KLOTZ, L., FRESCO. J., (1964), C. R. Acad. Sc., 259,

27 MEROLA, A. T., DAVIS, F. F. , (1962), Bioch. Biophys. Acta, 55, 431.

28 MICHELSON, A. M., MASSOULIE, J., GUSCHLBAUER, W., (1967), Progress in Nucléic acid Research and Molecular Biology, 6 , 98.

29 Idem, 116.

30 PIERPOINT, N. S., (1956), Bioch. Biophys. Acta, 21, 136.

31 PITT, D., GALPIN, M., (1971), Planta, 101, 333.

32 REDDI, K. K., (1958), Bioch. Biophys. Acta, 28, 386.

33 REDDI, K. K., MAUSER, L. J., (1965), Proc. Nat. Acad. Sc. USA, 53, 607.

34 REDDI, K. K., (1966), in Procedures in Nucleic Acid Research (CANTONI, G.L.,an DAVIES, R. R., eds), p. 71, Harper Raw, New-York.

35 Idem, 318.

36 REIGNIER, C., BURI, J.F., (1971), Ann. Biol. annm. Bioch. Biophys., 1, 85

37 SHUSTER, L., (1957), J. Biol. Chem., 229, 289.

38 SODEK, L., WRIGHT, S. T. C., WILSON, C. M., (1970), Plant Cell Physiol, 11, 16

39 TRAPY, G. (1974), Etude des activités ribonucléolytiques d'extraits d'ARN de méristène de Fève, Thèse 3ième Cycle, PARIS.

40 TRAPY, G., ESNAULT, R., ZULLY-FODILL, Y., (1974), C. R. Acad. Sc., 279, 1785.

41 TUVE, T. W., ANFINSEN, C. B., (1960), J. Biol. Chem. 235, 3437.

42 UDVARDY, J., (1970), Bioch. Biophys. Acta, 206, 392.

43 WALTERS, T. L., LORING, H. S., (1968), J. Biol. Chem. 241, 2870.

44 WILSON, C. M., (1963), Bioch. Biophys. Acta, 68, 177.

45 WILSON, C. M., (1967), J. Biol. Chem., 242, 2260.

46 WILSON, C. M., (1968), Plant Physiol., 43, 1332.

47 Idem, 1339.

48 WILSON, C. M., (1971), Plant Physiol., 48, 64.

49 WILSON, C. M., (1975), Ann. Rev. Plant. Physiol., 26, 187.

50 WYEN, N. V., UDVARDY, J., SOLYMOSY, F., MARRE, E., FARKAS, G. L., (1969), Bioch. Biophys. Acta, 191, 588

51 WYEN, N. V., FARKAS, G. L., (1971), Biochem. Physiol. Pflanz., 162, 220.

52 WYEN, N. V., ERDEI, S., FARKAS, G. L., (1971), Bioch. Biophys. Acta, 232, 472.

53 WYEN, N. V., UDVARDY, J., FARKAS, G. L., (1971), Phytochem., 10, 765.

54 WYEN, N. V., UDVARDY, J., ERDEI, S., FARKAS, G. L., (1972), Viralogy, 48, 337.

55 WYEN, N. V., ERDEI, S., UDVARDY, J., BAGI, G., FARKAS, G. L., (1972), J. Exp. Botany, 23, 37.

56 ZELITCH, I. (1971), In Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity Acad. Press, New-York and London.